



Design and development of new ligands of ABCG2 and MRP1 transporters targeting the Multidrug Resistance (MDR).

Florine Lecerf - Schmidt

► To cite this version:

Florine Lecerf - Schmidt. Design and development of new ligands of ABCG2 and MRP1 transporters targeting the Multidrug Resistance (MDR).. Organic chemistry. Université Grenoble Alpes; Université de Genève, 2015. German. NNT : 2015GREAV012 . tel-01280345

HAL Id: tel-01280345

<https://theses.hal.science/tel-01280345>

Submitted on 29 Feb 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITÉ
DE GENÈVE



UNIVERSITÉ
Grenoble
Alpes

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

préparée dans le cadre d'une cotutelle entre l'Université Grenoble Alpes et l'Université de Genève

Spécialité : **Chimie-Biologie**

Arrêté ministériel : le 6 janvier 2005 - 7 août 2006

Présentée par

Florine LECERF-SCHMIDT

Thèse dirigée par **Ahcène BOUMENDJEL**

Co-dirigée par **Pierre-Alain CARRUPT** et **Alessandra NURISSO**

Co-encadrée par **Basile PERES**

préparée au sein du **Département de Pharmacochimie Moléculaire** (Grenoble)
et de la **Section des Sciences Pharmaceutiques** (Genève)

dans l'École Doctorale de Chimie et Sciences du Vivant

Conception et développement de nouveaux ligands des transporteurs ABCG2 et MRP1 dans le cadre de la résistance à de multiples drogues anticancéreuses

Thèse soutenue publiquement le **23 octobre 2015**, devant le jury composé de :

Pr. Olivier RENAUDET

Professeur, Université Grenoble Alpes, *Président du jury*

Pr. Patricia MELNYK

Professeur, Université Lille 2, *Rapporteur*

Pr. Michel VIDAL

Professeur, Université Paris Descartes, *Rapporteur*

Dr. Hélène BAUBICHON-CORTAY

Maître de conférences, Université Lyon 1, *Examineur*

Dr. Laura GORACCI

Maître de conférences, Université de Pérougia, *Invitée*

Pr. Ahcène BOUMENDJEL

Professeur, Université Grenoble Alpes, *Directeur de thèse*

Pr. Pierre-Alain CARRUPT

Professeur, Université de Genève, *Co-directeur de thèse*

Dr. Alessandra NURISSO

Maître assistant, Université de Genève, *Co-directrice de thèse*

Dr. Basile PERES

Maître de conférences, Université Grenoble Alpes, *Co-encadrant de thèse*



REMERCIEMENTS

Je souhaite dédier ces quelques lignes aux personnes qui m'ont permis de mener à bien ce projet, qui m'ont suivi tout au long de ces trois années et m'ont tant apporté d'un point de vue scientifique, professionnel et humain.

En premier lieu, je tiens à dire un grand merci au Pr. Ahcène Boumendjel, pour son soutien au quotidien, sa disponibilité, son œil avisé et pour m'avoir donné la liberté de construire mon projet. Je remercie le Dr. Basile Pérès, pour tout ce qu'il m'a appris, ses « méthodes à la Saïd », ses blagues, son énergie infinie, sa motivation et sa bonne humeur éternelle. Je remercie également le Pr. Pierre-Alain Carrupt pour son accueil au sein de la Section des Sciences Pharmaceutiques de Genève et le Dr. Alessandra Nurisso, pour son aide, son sourire et sa confiance lors de mon séjour à Genève.

Je tiens à remercier chaleureusement les rapporteurs de cette thèse, le Pr. Patricia Melnyk et le Pr. Michel Vidal ainsi que les examinateurs, le Pr. Olivier Renaudet et le Dr. Hélène Cortay pour avoir accepté de juger ce travail.

Une partie de ce travail n'aurait pu être réalisée sans l'aide précieuse du Dr. Claudia Simões-Pires et du Dr. Laura Goracci. Je tiens à les remercier pour leur patience et leur soutien.

J'adresse mes sincères remerciements à l'ensemble des collaborateurs avec lesquels j'ai eu l'opportunité de travailler et sans qui ce travail n'aurait pu aboutir. Je remercie tout d'abord le Dr. Attilio Di Pietro et le Dr. Hélène Cortay de Lyon, ainsi que l'ensemble de leur équipe (Charlotte Gauthier, Evelyn Winter, Doriane Lorendeau, Lauriane Dury, Gustavo Jabor-Gozzi, Rachad Nasr et Amanda Andrade-Pires), pour nos collaborations riches en échanges scientifiques et leur disponibilité sans faille. Je remercie également le Dr. Léa Payen et le Dr.

Mylène Honorat pour la réalisation des tests in vivo, ainsi que le Dr. Emerson Ferreira Queiroz et le Dr. Thierry Lomberget pour leur collaboration sur le projet du tramadol.

Un grand merci également à l'ensemble des membres du DPM sans qui cette thèse n'aurait pas été la même. Je remercie tout d'abord les personnes de l'équipe MedChem qui m'ont aidé et soutenu lors de ces trois années : Antoine, Ben, Isa, Jean-Luc, Marie-Carmen, Martine, Philippe, Serge et Yung. Je remercie en particulier Marine, Romain et Julien, pour leur relecture de ce manuscrit et leurs conseils plus que précieux. Je remercie l'ensemble des personnes du deuxième étage, pour leur bonne humeur intarissable. Une thèse, c'est également de belles rencontres qui se transforment en amitié. Ainsi une grande pensée va aux doctorants et post-doctorants que j'ai eu la chance de rencontrer et qui ont rendu ces trois années inoubliables : Ben, Cédric, Doudou, Elina, Emma, Jean-Robert, Jeff, Julien, Kim, Laurent, Luma, Matt, Momo, Noémie, Sam, Simon, Vinicus et bien sûr ma coloc de choc Flavia, qui a eu le courage de me supporter pendant trois ans. Un merci également à Laetitia : nos rendez-vous sportifs hebdomadaires et nos discussions vont me manquer.

Je remercie aussi l'équipe de Genève, qui a eu la gentillesse de m'accueillir et avec qui j'ai passé de très bons moments, et en particulier Sylvia, pour sa patience et son aide dans l'organisation de ma soutenance.

Un grand merci aux stagiaires que j'ai eu la chance d'encadrer et dont l'aide fut plus que précieuse : Alex, Kim, Malik et Olivier.

Je remercie le Ministère délégué à l'Enseignement Supérieur et à la Recherche et la région Rhône-Alpes pour leurs supports financiers.

Je terminerai en remerciant mes parents, qui ont toujours cru en moi, ont toujours été présents dans les bons et les mauvais moments et m'ont fait confiance jusqu'au bout. Je souhaite leur dédier ce travail. Et un énorme merci à toute ma famille et à mes amis sans qui je ne serai pas celle que je suis aujourd'hui.

A

BRÉVIATIONS

A β	Amyloïde β
ABC	ATP-Binding Cassette
ABCP	ABC transporter in Placenta
ADME	Absorption, Distribution, Métabolisme et Excrétion
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADP	Adénosine DiPhosphate
AML	Acute Myeloid Leukemia
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique Messenger
ATP	Adénosine TriPhosphate
AUC	Aire sous la courbe
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein
BHK	Baby Hamster Kidney
BOP-Cl	Chlorure de Bis (2-oxo-3-oxazolidinyl)phosphonique
BOC	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
COSY	Correlation spectroscopy
CuAAC	Cycloaddition 1,3-dipolaire azoture-alcyne catalysée par le cuivre (I)
DDQ	2,3-Dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
DIEA	<i>N, N</i> -Diisopropyléthylamine
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthyl sulfoxide
DMSO-d ₆	Diméthyl sulfoxide deutéré
DTNB	Acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque)
E ₂ 17 β G	17 β -estradiol 17-(β -D-glucoronide)

EC ₅₀	Concentration donnant 50% de l'effet maximal
ECL	ExtraCellular Loop
EDCI	1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
ESI	Electron Spray Ionization
FDA	Food and Drug Administration
FLAP	Fingerprints for Ligands and Proteins
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
FTC	Fumitremorgin C
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion disulfide
GST	Glutathion-S-Transférase
H460	Cellules de cancer du poumon humain à grandes cellules
H460MX	Cellules de cancer du poumon humain résistantes à la mitoxantrone
H69AR	Cellules de cancer du poumon humain à petites cellules résistantes à la doxorubicine
HEK	Human Embryonic Kidney
HMBC	Heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy
HOBt	Hydroxybenzotriazole
HPLC	High performance liquid chromatography
HSQC	Heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy
HSV	Herpes Simple Virus
IBCP	Institut de Biologie et de Chimie des Protéines
IC ₅₀	Concentration donnant 50% de l'inhibition maximale
ICL	IntraCellular Loop
IG ₅₀	Concentration donnant 50% de la mort cellulaire maximale (toxicité)
IQ	2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline
KDa	Kilo Dalton
KO	Knock Out
LC-MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
LDA	<i>N, N</i> -diisopropylamidure de lithium
LDL	Lipoprotéine de basse densité
LTC ₄ /LTD ₄ /LTE ₄	Leucotriène C ₄ /D ₄ /E ₄
MCF7	Michigan Cancer Foundation-7 (cellules de cancer du sein humain)

MDR	Multidrug resistance
MIF	Molecular Interaction Field / Champs d'interaction moléculaire
MRP1	Multidrug Resistance associated Protein 1
MTT	Sel de bromure de 3-(4,5-diméthyl-2-thiazolyl)-2,5-diphényl-2 <i>H</i> - tétrazolium
MXR	Mitoxantrone Resistance gene
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NBD	Nucleotide Binding Domain
NCI	National Cancer Institute
NCI-H69	Cellules parentales de cancer du poumon à petites cellules
NIH-3T3	Cellules murines embryonnaires
NMO	<i>N</i> -méthylmorpholine- <i>N</i> -oxyde
NOESY	Nuclear Overhauser effect spectroscopy
PAL	Phénylalanine ammonia lyase
PCA	Analyse en composantes principales (Principal Component Analysis)
PCC	Chlorochromate de pyridinium
P-gp	Glycoprotéine-P
PhIP	2-amino-1-méthyl-6-phénylimidazo[4,5- <i>b</i>]pyridine
Pi	Phosphate Inorganique
PIF	Champ d'interaction pharmacophorique
PLS	Régression par les moindres carrés partiels (Partial Least-Squares)
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RMSD	Root Mean Square Deviation
SAM	S-adénosylméthionine
SCID	Severe Combined ImmunoDeficiency
Sf9	Lignée cellulaire issue de cellules d'insecte (<i>Spodoptera frugiperda</i>)
siRNA	small interfering RNA/ petits ARN interférents
SP	Side Population
SPECS	banque de données de composés disponible en ligne
TBAB	Bromure de tétrabutylammonium
TBTU	Tétrafluoroborate de <i>N,N,N',N'</i> -Tétraméthyl- <i>O</i> -(benzotriazol-1- yl)uronium
TCTP	Translationnally Controlled Tumor Protein

TFA	Acide trifluoroacétique
THF	Tétrahydrofurane
TJ	Tight Junction
TLC	Thin Layer Chromatography
TM	Hélice transmembranaire
TMD	Domaine transmembranaire (TransMembrane Domain)
TNB	Acide 2-nitro-5-mercaptopbenzoïque
TOF	Time of flight
Trp-P-1	3- amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole
UV	Ultra Violet

T ABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION GÉNÉRALE	17
CHAPITRE 1. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	23
I. Le cancer et le phénotype MDR	25
I.1. LE CANCER	25
I.2. LES TRAITEMENTS	25
I.2.1. La chirurgie	26
I.2.2. La radiothérapie	26
I.2.3. La chimiothérapie	26
I.3. LE PHÉNOTYPE MDR	29
II. Les transporteurs ABC	32
II.1. GÉNÉRALITÉS	32
II.2. TOPOLOGIE GÉNÉRALE DES TRANSPORTEURS ABC	34
II.2.1. Les domaines transmembranaires (TMDs)	34
II.2.2. Les domaines nucléotidiques cytoplasmiques (NBDs)	35
II.2.3. Organisation générale des transporteurs ABC	37
II.3. MÉCANISME DE TRANSPORT DES PROTÉINES ABC	39
II.3.1. Le modèle « Switch »	39
II.3.2. Le modèle « Constant contact »	41
II.3.3. Le modèle « Reciprocating twin channel »	42
II.4. PATHOLOGIES ASSOCIÉES AUX TRANSPORTEURS ABC HUMAINS	44
II.4.1. Les pathologies génétiques	44
II.4.2. Les transporteurs ABC impliqués dans le phénotype MDR	45

II.4.3.	Lutte contre la chimiorésistance due aux transporteurs ABC	45
---------	--	----

CHAPITRE 2. CONCEPTION, SYNTHÈSE, ACTIVITÉ BIOLOGIQUE ET ÉTUDE COMPUTATIONNELLE DE NOUVEAUX MODULATEURS DE LA PROTÉINE ABCG2

51

Avant-propos

53

I. La protéine ABCG2 : structure, fonctions biologiques et implication dans le phénotype MDR

55

I.1. STRUCTURE ET FONCTIONS BIOLOGIQUES D'ABCG2

55

I.1.1. Découverte de la protéine 55

I.1.2. Topologie et structure d'ABCG2 55

I.1.3. La dimérisation 57

I.1.4. Les résidus importants d'ABCG2 58

I.1.5. Les substrats d'ABCG2 59

I.1.6. Localisation tissulaire et cellulaire d'ABCG2 60

I.1.7. Rôles physiologiques d'ABCG2 61

I.1.8. Les pathologies associées à ABCG2 64

I.2. LA PROTÉINE ABCG2 COMME CIBLE BIOLOGIQUE DANS LE TRAITEMENT DE LA CHIMIORÉSISTANCE

66

I.2.1. Inhibition de la protéine ABCG2 66

I.2.2. Inhibiteurs connus d'ABCG2 67

I.2.3. Travaux antérieurs au sein du laboratoire 71

I.2.4. Le **MBL-II-141**, meilleur inhibiteur mis au point à ce jour 72

II. Travaux personnels : conception, synthèse et évaluation biologique de nouveaux inhibiteurs actifs, sélectifs et non toxiques d'ABCG2

78

II.1. OBJECTIFS DES TRAVAUX PERSONNELS 78

II.2. CHOIX DES MOLÉCULES À SYNTHÉTISER 78

II.3. SYNTHÈSE DES ANALOGUES DU **MBL-II-141** 80

II.3.1.	Re-synthèse du MBL-II-141	80
II.3.2.	Synthèse des analogues issus de la pharmacomodulation 1	85
II.3.3.	Synthèse des analogues issus de la pharmacomodulation 2	86
II.3.4.	Synthèse des analogues issus de la pharmacomodulation 3	88
II.3.5.	Synthèse des analogues issus de la pharmacomodulation 4	89
II.3.6.	Synthèse des analogues issus de la pharmacomodulation 5	94
II.3.7.	Synthèse des analogues issus de la pharmacomodulation 6	96
II.3.8.	Synthèse des analogues issus de la pharmacomodulation 7	97
II.4.	ÉVALUATION BIOLOGIQUE DES NOUVEAUX ANALOGUES DU MBL-II-141	98
II.4.1.	Procédés d'évaluation biologique des analogues du MBL-II-141	98
II.4.2.	Relations structure-activité (RSA) issues de la pharmacomodulation 1 : modulation de la position du groupement <i>para</i> -bromobenzyloxy porté par la chromone	102
II.4.3.	RSA issues de la pharmacomodulation 2 : modulation de la nature et de la position du groupement sur le cycle benzyloxy	105
II.4.4.	RSA issues de la pharmacomodulation 3 : modulation de la nature et de la position de la substitution du groupement porté par le cycle indolique	109
II.4.5.	RSA issues de la pharmacomodulation 4 : méthylation des azotes indolique et amidique	111
II.4.6.	RSA issues de la pharmacomodulation 5 : introduction d'un cycle triazolique	115
II.4.7.	RSA issues de la pharmacomodulation 6 : suppression de l'amide central	117
II.4.8.	RSA issues de la pharmacomodulation 7 : introduction d'un motif acide aminé	119
II.5.	CONCLUSIONS DES ÉTUDES DE RELATIONS STRUCTURE-ACTIVITÉ	123
II.6.	PERSPECTIVES	124

III. Éluclation des propriétés des sites d'interaction de la protéine ABCG2 à l'aide de pharmacophores	127
III.1. LES DIFFÉRENTS TYPES D'INHIBITEUR D'ABCG2	127
III.1.1. Mise en évidence de plusieurs sites d'interaction avec ABCG2	127
III.1.2. L'hypothèse de quatre sites d'interaction avec ABCG2	129
III.1.3. La construction de modèles pharmacophores afin de différencier les sites 3 et 4	131
III.2. MATÉRIEL ET MÉTHODES	132
III.2.1. La base de données	132
III.2.2. Les logiciels utilisés pour la détermination et l'analyse des pharmacophores	134
III.3. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS	142
III.3.1. Sélection des composés pour la création des pharmacophores pour les sites 3 et 4	142
III.3.2. Génération des modèles pharmacophores pour les sites 3 et 4	148
III.3.3. Comparaison et sélection des meilleurs modèles pharmacophores	150
III.3.4. Criblages virtuels basés sur les pharmacophores et sélection des composés pour les tests <i>in vitro</i>	161
III.4. CONCLUSION	164
 IV. Conclusion du chapitre 2	 165
 CHAPITRE 3. MODULATION DE LA PROTÉINE MRP1	 167
 Avant-propos	 169
 I. La protéine MRP1 : Structure, fonctions biologiques et implication dans le phénotype MDR	 171
I.1. STRUCTURE ET FONCTIONS BIOLOGIQUES DE MRP1	171
I.1.1. Découverte de la protéine	171

I.1.2.	Topologie de la membrane de MRP1	171
I.1.3.	Élucidation de la structure et modèle par homologie	174
I.1.4.	Les résidus identifiés de MRP1	176
I.1.5.	Expression de MRP1	177
I.1.6.	Les substrats de MRP1	178
I.1.7.	Les modes de transport de MRP1	179
I.1.8.	Cycle de transport de MRP1	181
I.1.9.	L'activité ATPasique de MRP1	182
I.1.10.	Les rôles physiologiques de MRP1	183
I.2.	IMPLICATION DE MRP1 DANS LA CHIMIORÉSISTANCE	183
I.2.1.	Inhibition de la protéine MRP1	184
I.2.2.	MRP1 et la sensibilité collatérale	190

II. Travaux personnels : conception, synthèse et évaluation biologique de nouveaux modulateurs de MRP1 ciblant la sensibilité collatérale

197

II.1.	OBJECTIFS DES TRAVAUX PERSONNELS	197
II.2.	CHOIX DES MOLÉCULES CIBLES	197
II.3.	PROCÉDÉS D'ÉVALUATION BIOLOGIQUE DES ANALOGUES SYNTHÉTISÉS	198
II.3.1.	Détermination de l'efflux net de GSH	198
II.3.2.	Détermination de la cytotoxicité	200
II.4.	PHARMACOMODULATION 1 : LES DIMÈRES DE FLAVONOÏDES	200
II.4.1.	Les dimères d'apigénine, inducteurs de sensibilité collatérale chez MRP1	200
II.4.2.	Synthèse des dimères ciblés	203
II.4.3.	Évaluation biologique des dimères ciblés	208
II.5.	PHARMACOMODULATION 2 : MODULATION DE LA SUBSTITUTION EN POSITION 3 DE LA FLAVONE	209
II.5.1.	Impact de la position 3 de la flavone sur la sensibilité collatérale	209

II.5.2.	Synthèse des analogues <i>O</i> -alkylés et <i>C</i> -alkylés en position 3 de la flavone	211
II.5.3.	Évaluation biologique des analogues <i>O</i> -alkylés et <i>C</i> -alkylés en position 3 de la flavone	215
II.6.	PHARMACOMODULATION 3 : INTRODUCTION D'UN MOTIF FERROCÈNE	216
II.6.1.	Le groupement ferrocène, pionnier de la chimie bioorganométallique	216
II.6.2.	Synthèse des dérivés ferrocéniques de flavonoïdes	219
II.6.3.	Évaluation biologique des dérivés ferrocéniques de flavonoïdes	225
II.6.4.	Perspectives	229
III.	Conclusion du chapitre 3	230
	CHAPITRE 4. SYNTHÈSE BIOMIMÉTIQUE DU TRAMADOL	231
	Avant-propos	233
I.	Le tramadol et <i>Nauclea latifolia</i>	235
I.1.	LE TRAMADOL, UTILISATION ET ACTIVITÉS BIOLOGIQUES	235
I.2.	<i>NAUCLEA LATIFOLIA</i> , UNE PLANTE AUX MILLE VERTUS	236
I.2.1.	Activités antiplasmodiales	237
I.2.2.	Activités anthelminthiques	238
I.2.3.	Activités antibactériennes	239
I.2.4.	Activités hypoglycémique et hypocholestérolémique	239
I.2.5.	Activités neuropharmacologiques	240
I.2.6.	Activités antinociceptives	240
I.2.7.	Activités antivirales	242
I.2.8.	Activités antipyrétiques	242
I.3.	COMPOSÉS EXTRAITS DE <i>NAUCLEA LATIFOLIA</i>	243

I.4.	DÉCOUVERTE ET EXTRACTION DU TRAMADOL	246
I.4.1.	Isolement du tramadol au sein de l'extrait d'écorce de <i>Nauclea latifolia</i>	246
I.4.2.	Confirmation de la présence du tramadol au sein de <i>Nauclea latifolia</i>	248
II.	Travaux personnels : synthèse biomimétique du tramadol	250
II.1.	OBJECTIFS DES TRAVAUX PERSONNELS	250
II.2.	VOIE BIOSYNTHÉTIQUE PROPOSÉE	250
II.2.1.	Voie de biosynthèse de l'intermédiaire 59	251
II.2.2.	Voie de biosynthèse de l'intermédiaire 60	253
II.2.3.	Synthèse de l'intermédiaire clé, le 7-(1-méthoxyphényl)-7-oxoheptanal 69	254
II.2.4.	Cyclisation de l'intermédiaire 69 et obtention du tramadol	254
II.3.	CARACTÉRISATION DU TRAMADOL AU SEIN DU BRUT RÉACTIONNEL ET ANALOGUES FORMÉS	256
II.3.1.	Détection du tramadol au sein des bruts réactionnels	256
II.3.2.	Purification et caractérisation du tramadol formé	258
III.	Conclusion du chapitre 4	264
	CONCLUSION GÉNÉRALE	267
	PARTIE EXPÉRIMENTALE	273
I.	Material and methods	275
II.	Synthesis protocols	277
II.1.	SYNTHESIS OF ABCG2 DERIVATIVES	277
II.1.1.	NMR analysis	277
II.1.2.	General procedures	283
II.1.3.	Synthesis protocols for ABCG2 derivatives	287

II.2.	SYNTHESIS OF MRP1 DERIVATIVES	338
II.2.1.	Synthesis of flavonoid dimers	338
II.2.2.	Synthesis of <i>O</i> -alkylated and <i>C</i> -alkylated derivatives of flavone	349
II.2.3.	Synthesis of ferrocene derivatives	359
II.3.	BIOMIMETIC SYNTHESIS OF TRAMADOL	367
II.3.1.	Synthesis of 7-(3-methoxyphenyl)-7-oxoheptanal	367
II.3.2.	Synthesis of (+/-)-tramadol and analysis of side products	370
III.	Analysis of tramadol	373
III.1.	UHPLC-PDA-ESI-MS ANALYSIS OF TRAMADOL	373
III.2.	SEMI-PREPARATIVE HPLC-UV ISOLATION FOR ANALYSIS OF TRAMADOL	373
	BIBLIOGRAPHIE	375
I.	Valorisation des travaux de thèse	377
I.1.	PUBLICATIONS	377
I.2.	COMMUNICATIONS ORALES	377
I.3.	POSTERS	377
II.	Notes et références	379
	ANNEXES	413

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Le cancer est l'une des principales causes de mortalité dans le monde et le nombre de nouveaux cas détectés et de décès ne cessent d'augmenter chaque année. D'après l'Organisation Mondiale de la Santé, en 2012, on comptait approximativement 14 millions de nouveau cas de cancer et 8,2 millions de décès liés à cette maladie. Le nombre de décès pourrait augmenter jusqu'à 11,5 millions en 2030. Les principaux types de cancers sont les cancers du poumon, du foie, de l'estomac, du sein, de l'œsophage et le cancer colorectal. Le tabagisme, une mauvaise alimentation, le manque d'exercice physique ou encore la consommation d'alcool sont les principaux facteurs de risque. Plus de 60% des nouveaux cas de cancer surviennent en Afrique, en Asie, en Amérique Centrale et en Amérique Latine. Ces régions représentent 70% des décès par cancer dans le monde. Ainsi, la lutte contre ces maladies constitue un enjeu majeur.

La chimiothérapie est l'un des traitements les plus utilisés pour lutter contre les cancers généralisés et/ou métastatiques. Malheureusement, celle-ci se heurte à un problème de taille : le développement d'une résistance des cellules cancéreuses face à de nombreux agents anticancéreux, rendant ainsi ce type de traitement inefficace. Ce phénomène se nomme phénotype de résistance à de multiples drogues (MDR pour *MultiDrug Resistance*). Plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine de ce phénotype. L'un d'entre eux est la surexpression de protéines membranaires, appartenant à la famille des transporteurs ABC, jouant le rôle de pompes à efflux capables de transporter activement les agents anticancéreux hors des cellules cancéreuses. Parmi les transporteurs ABC impliqués dans cette chimiorésistance, on retrouve la glycoprotéine-P (ABCB1/P-gp), la Multidrug Resistance associated Protein 1 (ABCC1/MRP1) et la Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2/BCRP).

Afin de pallier au phénomène de chimiorésistance, le développement de nouveaux modulateurs de ces protéines est au cœur de nombreuses études. Au sein du Département de Pharmacophimie Moléculaire, nous nous intéressons particulièrement aux protéines ABCG2 et MRP1. La conception et la synthèse de nouveaux ligands issus de la famille des flavonoïdes ciblant ces protéines constituent l'axe principal de mes travaux de thèse. Les flavonoïdes rassemblent une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ces composés sont largement présents au sein de nombreuses plantes

INTRODUCTION GÉNÉRALE

médicinales ainsi que de nombreux fruits et légumes. Des activités biologiques variées ont été attribuées à cette classe de métabolites, telles que des activités antioxydantes, anticancéreuses, antibactériennes, antivirales, anti-inflammatoires ou anti-allergènes faisant ainsi des flavonoïdes une famille de choix dans la synthèse de nouveaux ligands.

Un premier objectif de cette thèse consiste en la conception et la synthèse d'inhibiteurs actifs, sélectifs et non toxiques d'ABCG2 capables de bloquer l'efflux des agents anticancéreux et de restaurer ainsi la sensibilité des cellules cancéreuses aux traitements chimiothérapeutiques. Ces composés, dérivés de chromones, sont issus de pharmacomodulations réalisées à partir de la structure d'un chef de file, le **MBL-II-141**, meilleur inhibiteur *in vitro* et *in vivo* d'ABCG2 mis au point à ce jour au sein du laboratoire.

L'ensemble des composés synthétisés se sont avérés être des inhibiteurs potentiels d'ABCG2. Cependant, uniquement un composé parvient à atteindre le **MBL-II-141** en termes d'index thérapeutique.

L'étude de l'influence de nos composés (ainsi que des inhibiteurs d'ABCG2 issus d'autres équipes) sur l'activité ATPasique du transporteur a permis d'apporter quelques hypothèses quant au mécanisme d'action de nos ligands sur la protéine. Quatre sites distincts d'interaction ont été mis en évidence par nos collaborateurs biologistes. Ceci nous a conduit à construire, à l'aide de la modélisation moléculaire, deux pharmacophores modélisant deux des quatre sites d'interaction de la protéine ABCG2 et d'apporter des premières hypothèses quant aux interactions possibles entre nos inhibiteurs et la protéine au niveau de ces deux sites d'interaction.

Un second objectif de cette thèse consiste en la conception et la synthèse de nouveaux modulateurs de la protéine MRP1 selon une toute autre stratégie thérapeutique : la sensibilité collatérale. En effet, il semblerait que, dans certains cas, les cellules cancéreuses résistantes puissent développer une hypersensibilité à certains composés. Concernant la protéine MRP1, cette sensibilité collatérale se traduit par l'induction d'un efflux massif de glutathion hors des cellules cancéreuses résistantes surexprimant la protéine. Le glutathion permettant de maintenir le potentiel redox de cellules et étant crucial dans la protection cellulaire contre les phénomènes de stress oxydant, son efflux massif induit la mort sélective par apoptose de ces cellules résistantes. Ce nouveau profil pharmacologique possède l'avantage de cibler uniquement les cellules cancéreuses tout en évitant les effets secondaires dus à l'action des

INTRODUCTION GÉNÉRALE

agents anticancéreux sur les cellules saines. Le vérapamil, inhibiteur de référence de la P-gp, s'avère être un très bon candidat pour la sensibilité collatérale de MRP1. Mais, en raison de sa forte cardiotoxicité aux concentrations thérapeutiques utilisées, de nombreuses études se sont tournées vers les flavones. En effet, des travaux antérieurs ont démontré l'efficacité de certains dérivés de flavone dans l'induction de la sensibilité collatérale. Dans le cadre de cette thèse, nous avons ainsi conduit un travail de pharmacomodulation afin de mettre au point de nouveaux ligands de MRP1 capables d'induire une sensibilité collatérale sur des cellules cancéreuses résistantes.

Le dernier volet de ce travail, minoritaire et absent du cadre initial de cette thèse, porte sur la synthèse biomimétique du tramadol, alcaloïde conçu et produit par synthèse, découvert en forte concentration au sein d'extraits d'un arbuste africain, le *Nauclea latifolia*. Nous sommes parvenus, dans le cadre de cette étude, à proposer et valider partiellement une synthèse biomimétique du tramadol, venant soutenir fortement l'hypothèse d'une origine naturelle du composé au sein de la plante.

Dans ce manuscrit, nous allons aborder les travaux soulignés ci-dessus selon le plan suivant : après une introduction sur le cancer et ses généralités, sur les transporteurs ABC ainsi que sur le phénotype de résistance, les travaux réalisés sur les protéines ABCG2 et MRP1 sont présentés. L'étude de chacune des deux protéines constitue un chapitre indépendant (chapitre 2 et 3). Le dernier chapitre porte sur les travaux entrepris sur la synthèse biomimétique du tramadol. Pour finir, la partie expérimentale, la bibliographie puis les annexes viennent clore ce manuscrit.

C HAPITRE **1.**

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I. Le cancer et le phénotype MDR

I.1. LE CANCER

Le corps humain est constitué de cellules dont les formes, les tailles et les fonctions sont très diverses. Suite à différents événements génétiques conduisant à la mutation de certains gènes, certaines cellules deviennent indisciplinées et résistantes aux systèmes de réparation de l'ADN et à l'apoptose, processus de mort programmée des cellules. Ces cellules, appelées cellules cancéreuses, sont donc des cellules altérées capables de se multiplier de manière anarchique, de s'adapter, de survivre et de se disséminer au sein de l'organisme. Les cellules cancéreuses commencent à proliférer conduisant à la formation de regroupement de cellules anormales appelées tumeurs. Une tumeur devient maligne lorsque les cellules cancéreuses débutent leur migration vers d'autres organes *via* le sang ou la lymphe : on parle alors de métastases. Il existe plus d'une centaine de cancers, définis en fonction de la cellule initiale dont ils sont issus. Une meilleure compréhension des différents mécanismes et des molécules impliquées dans leur développement a permis la mise au point de nouveaux traitements et médicaments.

I.2. LES TRAITEMENTS

La chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie constituent aujourd'hui les grandes catégories de traitement des cancers. Ces traitements dépendent du type de tumeur et de leur gravité. Ces stratégies peuvent être mises en œuvre indépendamment, employées successivement ou associées les unes aux autres.

I.2.1. La chirurgie

La chirurgie est un traitement locorégional qui permet d'extraire les tumeurs les plus importantes. Ce traitement est en général préconisé pour le cas des tumeurs solides, non métastatiques. Néanmoins, elle ne peut éliminer toutes les cellules cancéreuses et doit être souvent assistée de traitements complémentaires tels que la radiothérapie ou la chimiothérapie.

I.2.2. La radiothérapie

La radiothérapie est également un traitement locorégional des cancers. Cette technique consiste à utiliser des rayonnements capables d'altérer la composition de l'information génétique des cellules cancéreuses afin de les rendre incapables de se reproduire, tout en préservant le mieux possible les tissus sains et les organes à proximité.

Les traitements par chirurgie et radiothérapie concentrent leur action au niveau de la tumeur et de sa région avoisinante. Cependant, en cas de cancer en phase de généralisation, les traitements les plus efficaces sont les traitements systémiques tels que la chimiothérapie.

I.2.3. La chimiothérapie

Les traitements par chimiothérapie consistent à injecter, le plus souvent par voie intraveineuse, des substances xénobiotiques dont le but est d'enrayer ou de ralentir l'évolution de la prolifération des cellules tumorales. Ils s'utilisent dans le cas de métastases ou de cancers non localisés, comme ceux qui atteignent les globules blancs. Les médicaments employés tuent les cellules en agissant sur l'ADN, sur l'ARN ou sur les protéines des cellules, bloquant certaines étapes de la division cellulaire.

La chimiothérapie peut présenter quatre objectifs distincts :

- la **chimiothérapie à visée curative**, dont l'objectif est de détruire toutes les cellules cancéreuses métastatiques. C'est l'unique traitement capable de traiter les cancers non localisés comme les leucémies ou les cancers généralisés ;
- la **chimiothérapie néo-adjuvante** qui permet de réduire la taille de la tumeur avant un traitement localisé (chirurgie ou radiothérapie) ;

CHAPITRE 1. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

- la **chimiothérapie adjuvante** qui permet d'éliminer les cellules cancéreuses résiduelles éventuelles après un traitement localisé ;
- la **chimiothérapie palliative** dont l'objectif n'est pas de guérir du cancer mais de ralentir l'évolution de la maladie. Elle permet de soulager et de prolonger l'espérance de vie des patients.

Les agents anticancéreux peuvent être classés selon leur mécanisme d'action thérapeutique :

- **les agents antimétabolites**. Ils inhibent la synthèse des acides nucléiques, première étape nécessaire à toute multiplication cellulaire. On peut citer le méthotrexate (**Figure 1**) qui inhibe la dihydrofolate réductase, enzyme capitale dans le métabolisme de l'acide folique, indispensable à la synthèse de bases nucléiques ;¹

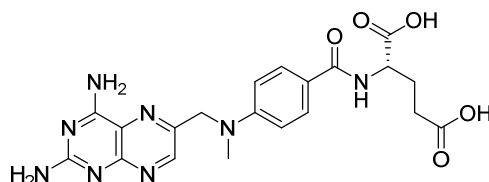


Figure 1 : Structure du méthotrexate.

- **les inhibiteurs d'enzymes impliquées dans la synthèse d'ADN**.² Les inhibiteurs de la topoisomérase I empêchent la reconstitution du brin d'ADN après le clivage, inhibant ainsi la synthèse d'ADN. Parmi ces inhibiteurs, on peut citer l'irinotécan et le topotécan (**Figure 2**). Les inhibiteurs de la topoisomérase II conduisent à la rupture des brins d'ADN. La doxorubicine et la mitoxantrone font partis de cette classe d'inhibiteurs. Ces deux inhibiteurs sont également des agents intercalants d'ADN ;

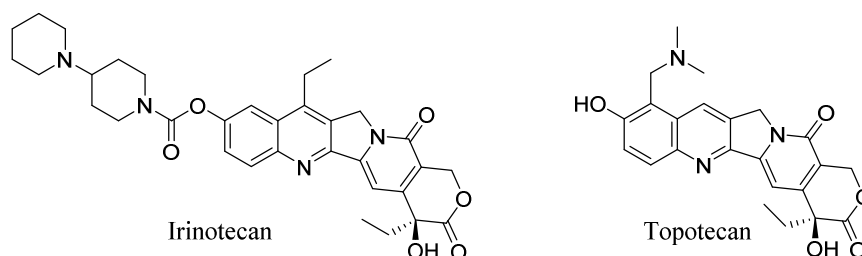


Figure 2 : Structure de l'irinotécan et du topotécan.

CHAPITRE 1. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

- **les agents alkylants.** Ils créent un lien chimique covalent fort avec les nucléotides de la chaîne ADN empêchant la réplication et conduisant à la mort cellulaire. C'est le cas du cisplatine,³ un complexe à base de platine (**Figure 3**) ;

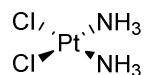


Figure 3 : Structure du cisplatine.

- **les agents intercalants.** Ils s'intercalent entre les brins d'ADN et conduisent à l'altération de la réplication et de la transcription de l'ADN. On peut citer la daunorubicine (**Figure 4**) ;⁴

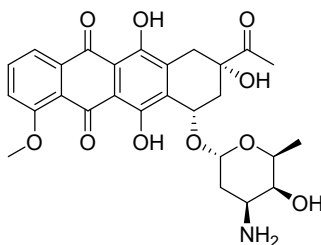
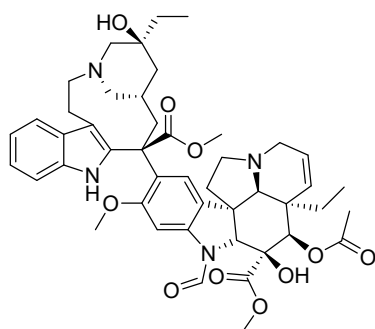
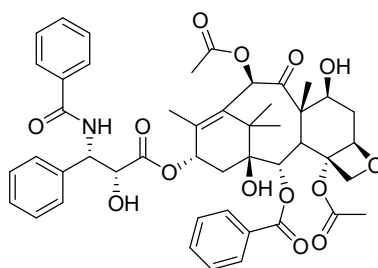


Figure 4 : Structure de la daunorubicine.

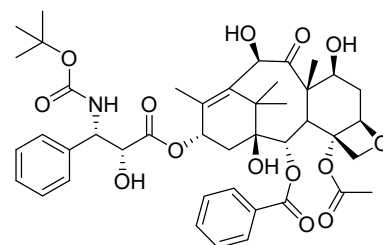
- **les poisons du fuseau cellulaire.**⁵ Ils agissent pendant la mitose, lorsque les chromosomes dédoublés migrent le long des tubules du fuseau cellulaire, vers un des deux pôles, avant la séparation des cellules. Ils entraînent une désorganisation des chromosomes au moment de la mitose. La vincristine, le paclitaxel (taxol) et son analogue, le docétaxel (taxotère), font partis de cette classe d'anticancéreux (**Figure 5**).^{6, 7}



Vincristine



Paclitaxel (taxol)



Docétaxel (taxotère)

Figure 5 : Structure de la vincristine, du paclitaxel et du docétaxel.

- **les inhibiteurs de la tyrosine kinase.** Ils bloquent les tyrosines kinases, protéines impliquées dans le processus de transduction du signal et intervenant dans l'initiation, la croissance et la genèse des tumeurs humaines. Parmi ces inhibiteurs, on peut citer l'imatinib, premier inhibiteur de la tyrosine kinase utilisé avec succès dans les tumeurs solides ou encore le sorafénib (**Figure 6**).⁸

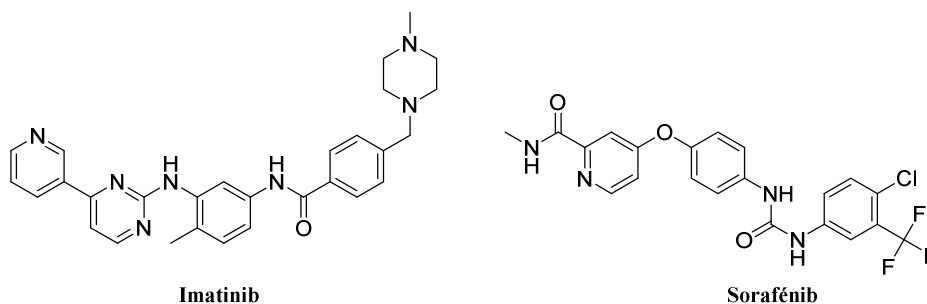


Figure 6 : Structure de l'imatinib et du sorafénib.

D'autres thérapies ciblées, telles que l'hormonothérapie, l'immunothérapie ou encore les anticorps monoclonaux émergent afin de réduire les effets néfastes sur les cellules non cancéreuses.

Dans certains cas, les cellules tumorales sont ou deviennent résistantes aux agents anticancéreux, conduisant ainsi à l'échec du traitement : on appelle ce phénomène **la chimiorésistance ou phénotype MDR** (*Multidrug resistance*).

I.3. LE PHÉNOTYPE MDR

L'efficacité de la chimiothérapie peut être limitée par le développement d'une résistance des cellules cancéreuses envers l'agent anticancéreux employé. Cette résistance peut être naturelle. En effet, certains cancers, tels que les cancers du rein ou de la thyroïde, sont naturellement résistants à tous les agents anticancéreux. Dans d'autres cas, les cellules cancéreuses, dans un premier temps sensibles, acquièrent une résistance au cours du traitement. Plusieurs mécanismes peuvent conduire à une résistance (**Figure 7**).⁹

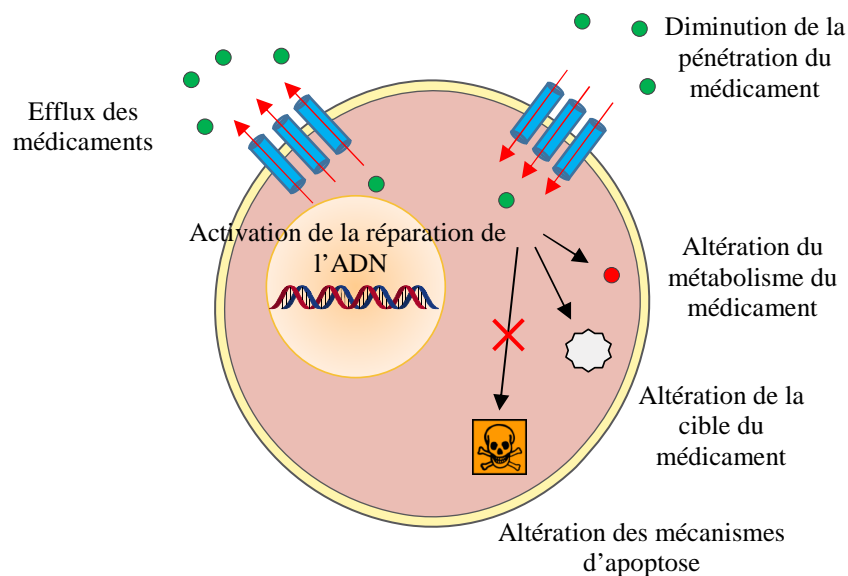


Figure 7 : Représentation des différents mécanismes de résistance de la cellule face aux agents anticancéreux.

Parmi ces mécanismes, on retrouve :

- **la diminution de la pénétration des agents anticancéreux au sein de la cellule** : une mauvaise vascularisation ou la présence de barrières, telles que la barrière hémato-encéphalique, peuvent rendre difficile l'accessibilité des médicaments aux cellules ;
- **le métabolisme du médicament** : Au sein de l'organisme, l'agent anticancéreux peut subir des processus de métabolisation qui comprennent trois phases : la phase I, ou métabolisme oxydant, au cours de laquelle les médicaments sont métabolisés par des enzymes tels que les cytochromes P450.¹⁰ On peut citer l'enzyme CYP3A4 impliquée dans la métabolisation du docétaxel en son dérivé hydroxylé inactif.^{11, 12} Le paclitaxel est également métabolisé par CYP3A4 mais aussi par l'enzyme CYP2C8.¹³ Les xénobiotiques peuvent également être métabolisés par des enzymes de phase II par conjugaison, notamment au glutathion (GSH), *via* l'activité de la glutathion-S-transférase (GST). Les enzymes de phase II protègent généralement les cellules normales d'agents endogènes ou exogènes électrophiles induisant un stress oxydant. Ces agents sont alors conjugués au GSH afin de former des complexes GSH-agents moins toxiques et facilement transportables hors des cellules. Ce même mécanisme est observé chez les cellules cancéreuses conduisant ainsi à une résistance aux agents antinéoplasiques en réponse au stress oxydant induit.^{14, 15} Ces métabolites conjugués sont ensuite transportés hors de la cellule *via* des transporteurs membranaires constituant la phase III ;

- **l'altération de la cible du médicament** : on peut observer des altérations quantitatives de la cible par augmentation de la concentration de la cible (la concentration de médicament devient alors insuffisante) ou diminution de la concentration de la cible (comme, par exemple, la diminution du taux de topoisomérases qui réduit l'activité des inhibiteurs de ces enzymes). Des altérations qualitatives telles que des mutations génétiques ponctuelles peuvent également modifier la cible. Des modifications conformationnelles peuvent empêcher la reconnaissance du principe actif. Par exemple, des mutations dans le gène codant pour la topoisomérase II confèrent une résistance à l'étoposide ou à l'amsacrine ;¹⁶
- **l'accroissement de la réparation des lésions de l'ADN** : Il existe plusieurs mécanismes de réparation de l'ADN qui permettent aux cellules cancéreuses d'échapper à la cytotoxicité induite par les agents anticancéreux ;
- **la mutation de protéines impliquées dans le mécanisme d'apoptose** : on observe l'inactivation de protéines pro-apoptotiques tels que la protéine p53, mutée dans 50% des cancers, induisant l'échec de l'apoptose et donc la chimiorésistance.¹⁷ La surexpression de protéines anti-apoptotiques telles que la protéine Bcl-2^{18, 19} ou la protéine TCTP (*Translationally Controlled Tumor Protein*) peuvent également être à l'origine du phénotype MDR ;²⁰
- **la diminution de l'accumulation intracellulaire des médicaments** : la surexpression de protéines membranaires, agissant comme pompes à efflux et capables de transporter les agents anticancéreux hors des cellules cancéreuses entraîne une réduction de leur concentration intracellulaire et donc de leur efficacité. Les cellules développent alors une résistance croisée à un grand nombre de xénobiotiques présentant une variété chimique et fonctionnelle étendue. Les protéines membranaires impliquées dans ce phénotype MDR appartiennent à la superfamille des **transporteurs ABC** (*ATP-Binding Cassette*).

II. Les transporteurs ABC

II.1. GÉNÉRALITÉS

Les transporteurs ABC constituent une large famille de protéines que l'on retrouve dans tout le règne vivant. En 1986, Higgins décrit pour la première fois une famille de protéines bactériennes se liant à l'ATP et impliquées dans le transport de composés (substrats).²¹ Ces protéines membranaires sont capables de transporter un grand nombre de substrats endogènes ou exogènes, des ions aux macromolécules, en utilisant l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP.

Les transporteurs ABC comportent tous un domaine transmembranaire variable (TMD pour « *TransMembrane Domain* ») et un domaine nucléotidique cytoplasmique (NBD pour « *Nucleotide Binding Domain* ») relativement conservé entre tous les transporteurs. Les transporteurs membranaires peuvent être divisés en deux groupes, les exportateurs et les importateurs. Tandis que les bactéries emploient les exportateurs et les importateurs ABC, les eucaryotes quant à eux possèdent, hormis quelques exceptions, uniquement des exportateurs. Chez *Escherichia coli*, 5% de la totalité du génome code pour ces transporteurs ABC qui sont au nombre de 80.²² Le génome des plantes en comporte plus de 100.²³

On dénombre 48 gènes distincts codant pour les transporteurs ABC dans le génome humain. Ces gènes peuvent être divisés en sept sous familles distinctes, de ABCA à ABCG, et classés selon leur organisation structurale et l'homologie de leurs acides aminés (**Tableau 1**).²⁴

CHAPITRE 1. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

Symbole	Alias	Gène	Expression	Fonction
ABCA1	ABC1	9q31.1	Nombreux tissus	Efflux des phospholipides et du cholestérol
ABCA2	ABC2	9q34	Cerveau	Résistance aux médicaments
ABCA3	ABC3, ABCC	16p13.3	Poumons	
ABCA4	ABCR	1p22.1-p21	Rétines, cellules photoréceptrices	Efflux de la <i>N</i> -rétinylidiène-PE
ABCA5		17q24	Muscles, cœurs, testicules	
ABCA6		17q24	Foie	
ABCA7		19p13.3	Leucocytes, thymus, rate, moelle osseuse	
ABCA8		17q24	Ovaires	
ABCA9		17q24	Cœur	
ABCA10		17q24	Muscles, cœur	
ABCA12		2q34	Estomac	
ABCA13		7p11-q11	Faible dans tous les tissus	
ABCB1	PGY1, MDR	7p21	Glandes surrénales, reins, cerveau	MDR
ABCB2	TAP1	6p21	Nombreux tissus	Transport de peptides
ABCB3	TAP2	6p21	Nombreux tissus	Transport de peptides
ABCB4	PGY3	7q21.1	Foie	Transport de phosphatidylcholine biliaire
ABCB5		7p14	Nombreux tissus	
ABCB6	MTABC3	2q36	Mitochondries	Transport du Fer
ABCB7	ABC7	Xq12-q13	Mitochondries	Transport de cluster Fe/S
ABCB8	MABC1	7q36	Mitochondries	
ABCB9		12q24	Cœur, cerveau	
ABCB10	MTABC2	1q42	Mitochondries	
ABCB11	SPGP	2q24	Foie	Transport de sels biliaires
ABCC1	MRP1	16p13.1	Nombreux tissus	MDR
ABCC2	MRP2	10q24	Foie	Efflux d'anions organiques + MDR
ABCC3	MRP3	17q21.3	Foie, intestins, poumons	MDR
ABCC4	MRP4	13q32	Prostate	Transport de nucléosides
ABCC5	MRP5	3q27	Nombreux tissus	Transport de nucléosides
ABCC6	MRP6	16p13.1	Reins, foie	
ABCC7	CFTR	7q31.2	Tissus exocrines	Canal ions chlorures
ABCC8	SUR	11p15.1	Pancréas	Régulation de canaux potassiques ATP-dépendants

CHAPITRE 1. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

ABCC9	SUR2	12p12.1	Cœur, muscles	Régulation de canaux potassiques ATP-dépendants
ABCC10	MRP7	6p21	Faible dans tous les tissus	
ABCC11		16q11- q12	Faible dans tous les tissus	
ABCC12		16q11- q12	Faible dans tous les tissus	
ABCD1	ALD	Xq28	Péroxyssomes	Transport d'acides gras à longue chaîne
ABCD2	ALDL1, ALDR	12q11- q12	Péroxyssomes	Transport d'acides gras
ABCD3	PXMP1, PMP70	1p22-p21	Péroxyssomes	Transport d'acides gras
ABCD4	PMP69, P70R	14q24.3	Péroxyssomes	Transport d'acides gras
ABCE1	OABP, RNS4I	4q31	Ovaires, testicules, rate	Inhibiteurs de la ribonucléase L
ABCF1	ABC50	6p21.33	Nombreux tissus	
ABCF2		7q36	Nombreux tissus	
ABCF3		3q25	Nombreux tissus	
ABCG1	ABC8, White	21q22.3	Nombreux tissus	Transport de cholestérol
ABCG2	ABCP, MXR, BCRP	4q22	Placenta, intestins	MDR
ABCG4	White2	11q23	Foie	
ABCG5	White3	2p21	Foie, intestins	Transport de stérols
ABCG8		2p21	Foie, intestins	Transport de stérols

Tableau 1 : Liste des transporteurs ABC humains.

II.2. TOPOLOGIE GÉNÉRALE DES TRANSPORTEURS ABC

Malgré leur diversité, les transporteurs ABC présentent des homologies de structure.

II.2.1. Les domaines transmembranaires (TMDs)

Pour la plupart des transporteurs ABC eucaryotes, chaque TMD est constitué de 6 hélices α -transmembranaires. Néanmoins dans certains cas, on peut dénombrer 5 à 11 hélices pour un même TMD.²⁵ Un transporteur contient ainsi entre 12 et 20 segments transmembranaires.^{26, 27}

Les hélices α -transmembranaires des deux TMDs sont disposées de sorte qu'elles puissent former un passage transmembranaire à travers lequel les substrats pourront être transportés. Les TMDs sont reliés par des boucles extracellulaires et intracellulaires pouvant être importantes dans la reconnaissance des substrats, dans le mécanisme de transport ou dans l'interaction avec les NBDs.²⁸ Tout en possédant une topologie similaire, les TMDs ne présentent généralement qu'une faible conservation de séquence entre les transporteurs. Ce manque de conservation de structure primaire est fortement lié à la diversité des substrats que sont capables de transporter les transporteurs ABC.

Des études cristallographiques et de mutagenèse indiquent le comportement différent des substrats sur les transporteurs ABC. Pour un grand nombre d'entre eux, tels que le transporteur maltose MalK issu d'*Escherichia coli*,^{29, 30} le substrat interagit en un point distinct avec les résidus des hélices α -transmembranaires. Au contraire, pour d'autres transporteurs, tels que la protéine P-gp, différents sites d'interaction avec les substrats se chevauchant ont été décrits faisant de cette protéine un transporteur polyspécifique.^{31, 32}

II.2.2. Les domaines nucléotidiques cytoplasmiques (NBDs)

Grâce à la forte conservation de leurs motifs, les NBDs représentent la marque de fabrique des transporteurs ABC. Les NBDs constituent le moteur énergétique des transporteurs ABC. En effet, l'ATP se fixe au NBDs et s'hydrolyse afin de fournir l'énergie nécessaire au transport de substrats.

Un grand nombre de structures cristallographiques des NBDs, telles que les structures de l'histidine perméase,³³ de Rad50³⁴ et de MJ0796³⁵ ont déjà été résolues permettant une meilleure compréhension de leur structure et de leur fonctionnement. Ces études ont permis l'identification d'acides aminés clés présents dans les motifs des NBDs.

Les NBDs sont constitués d'un sous-domaine principal contenant les motifs Walker A et B et d'un sous-domaine hélicoïdal contenant la signature S. Ce dernier motif est attaché au premier de manière flexible par la boucle Q *via* son *N*-terminal et par la boucle Pro *via* son *C*-terminal (**Figure 8**).³⁶

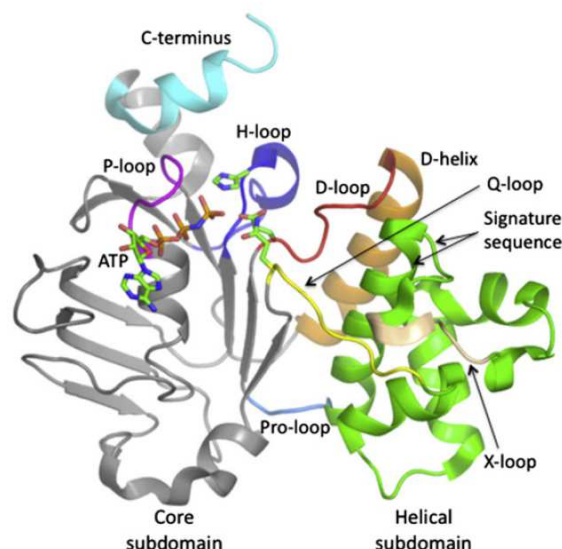


Figure 8 : Structure d'un NBD.³⁶ Le sous-domaine principal est coloré en gris et le sous domaine hélicoïdal est coloré en vert. Certaines séquences consensus et motifs sont représentés ainsi qu'une molécule d'ATP.

Chacun de ces motifs, détaillés ci-dessous, joue un rôle unique dans l'hydrolyse de l'ATP:

- **les motifs Walker A et Walker B**,³⁷ communs aux protéines qui fixent et hydrolysent l'ATP. Le motif Walker A permet la liaison à l'ATP/ADP par la chaîne phosphate.³⁸ Le motif Walker B possède un résidu d'acide aspartique formant une liaison de coordination avec l'ion magnésium, cofacteur nécessaire à l'hydrolyse de l'ATP ;³⁵
- **le motif Signature S** (ou motif C) caractérisé par la séquence consensus LSGGQ, situé entre Walker A et Walker B. Ce motif est caractéristique des transporteurs ABC. Il permet une interaction avec le phosphate γ de l'ATP ;
- **la boucle H**, impliquée dans la réaction catalytique d'hydrolyse de l'ATP ;
- **la boucle D** permet l'interaction entre les 2 NBDs pendant la formation du complexe liant l'ATP et l'ion magnésium ;
- **la boucle Q** relie les deux lobes des NBDs et est impliquée dans la transmission d'énergie aux TMDs ;
- **la boucle A** aide à positionner l'ATP dans le site catalytique grâce aux interactions entre les noyaux aromatiques du résidu tyrosine et de l'ATP.

II.2.3. Organisation générale des transporteurs ABC

Comme nous l'avons vu précédemment, ces transporteurs ABC comportent quatre domaines distincts, deux NBDs, sièges de l'hydrolyse de l'ATP et deux TMDs, lieu de fixation et de passage des substrats. Ces quatre domaines peuvent s'organiser de différentes façons. Chez les bactéries, ces quatre domaines peuvent être sous la forme d'une combinaison de sous unités individuelles ou appariées ou une combinaison de NBDs et/ou TMDs fusionnés.³⁹ Chez les eucaryotes, la majorité des transporteurs ABC sont constitués d'un seul polypeptide comportant ces quatre domaines fonctionnels. Certains sont constitués à partir de demi-transporteurs assemblés sous la forme d'homodimères ou d'hétérodimères. L'organisation des quatre domaines la plus répandue est représentée dans la **Figure 9**.

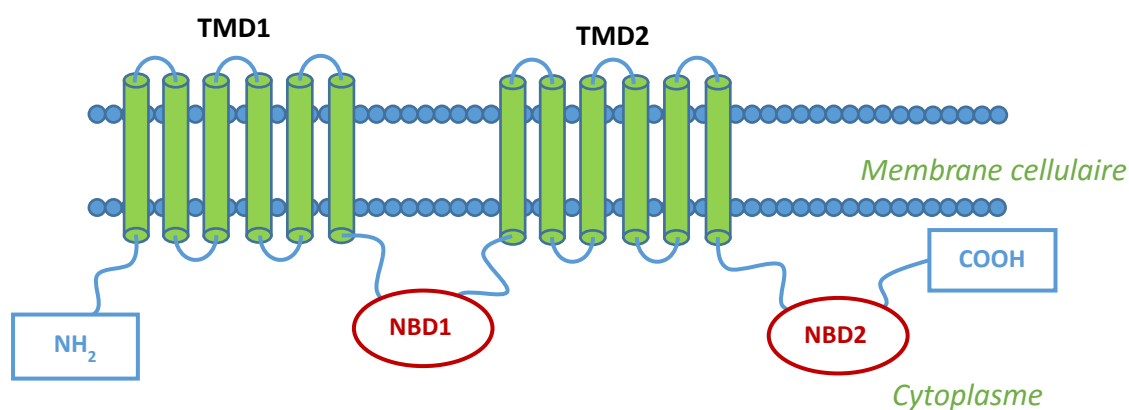


Figure 9 : Topologie générale des transporteurs ABC.

A l'heure actuelle, l'obtention de structures cristallines 3D haute résolution de protéines membranaires reste encore un challenge pour la biologie structurale. A ce jour, les structures de plus d'une dizaine de transporteurs seulement ont été résolues. Parmi eux, les transporteurs d'origine procaryote sont :

- **BtuCD**, importateur de la vitamine B12 ;⁴⁰
- le transporteur ABC codé par les gènes **HI1470** et **HI1471** ;⁴¹
- **Sav1866**, un transporteur ABC bactérien (**Figure 10A**) ;²⁸
- **MsbA** ;⁴²
- **le transporteur du maltose** ;^{29, 43, 44}
- le transporteur de molybdate **ModB2C2**⁴⁵ complexé avec sa protéine de liaison ModA ainsi que le transporteur molybdate/tungstate **ModBC** ;⁴⁶
- le transporteur de méthionine **MetNi** ;⁴⁷
- l'hétérodimère **TM287/288** ;⁴⁸

- le transporteur antibactérien **McjD**.⁴⁹

La P-gp de *Caenorhabditis elegans* chez le nématode a également été résolue⁵⁰ ainsi que les transporteurs ABC mitochondriaux **Atm1**⁵¹ et **NaAtm1**.⁵²

Pour finir trois structures ont été résolues chez les mammifères :

- **ABCB10**, un demi-transporteur de la mitochondrie chez l'homme (**Figure 10B**) ;⁵³
- la **glycoprotéine P** murine (**Figure 10C**) ;⁵⁴
- un homologue de la P-gp, **CmABCB1**.⁵⁵

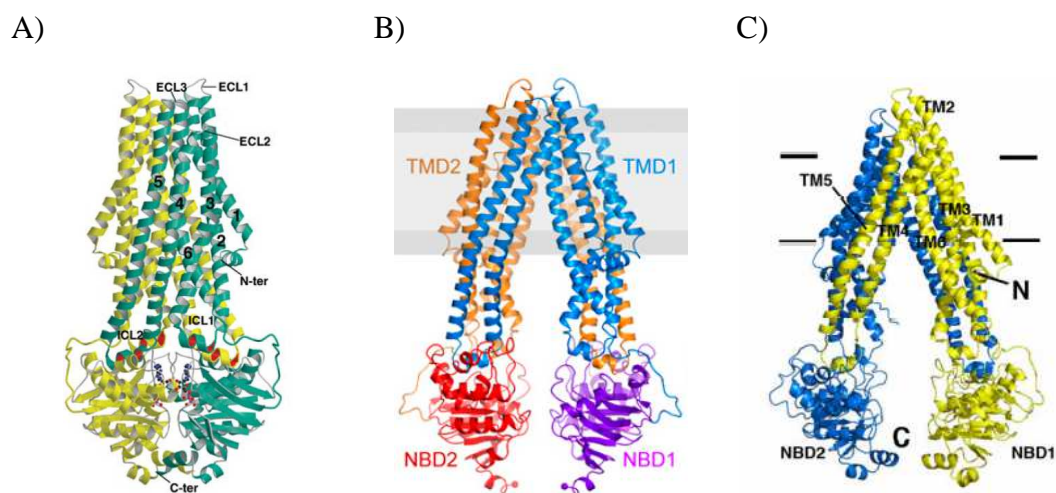


Figure 10 : Structures cristallographiques de Sav1866 (A),²⁸ d'ABCB10 (B)⁵³ et de la P-gp murine (C).⁵⁴

Ces structures tridimensionnelles soulignent la large variabilité conformationnelle au sein des transporteurs ABC. La plupart de ces structures ont été résolues dans leur conformation « inward-facing », pour laquelle les TMDs s'ouvrent vers le cytoplasme, en présence ou en absence de nucléotides. De plus, ont été observées différentes amplitudes de séparation des NBDs selon les espèces. Les structures cristallines des conformations « outward facing » pour lesquelles les TMDs s'ouvrent vers le milieu extracellulaire ont été observées uniquement chez deux protéines procaryotes liées à un nucléotide (Sav1866 et MsbA). La résolution récente de l'exportateur antibactérien McjD dans une conformation intermédiaire entre les conformations « outward-facing » et « inward-facing » permettra d'apporter de nouveaux éléments quant à la compréhension du mécanisme de transport de ces protéines ABC.⁴⁹

II.3. MÉCANISME DE TRANSPORT DES PROTÉINES ABC

Afin d'assurer leur fonction de transport, les protéines ABC doivent posséder deux NBDs. Ces deux NBDs forment un dimère symétrique de conformation « tête bêche » au sein duquel s'insèrent deux molécules d'ATP prises en « sandwich » dans deux cavités différentes. Au sein de ce qu'on appelle alors le « dimère sandwich », une molécule d'ATP se lie par l'intermédiaire du motif Walker A à NBD1 et par l'intermédiaire de la séquence signature à NBD2 et inversement pour la seconde molécule d'ATP (**Figure 11**). La formation de ce dimère sandwich des NBDs apporte l'énergie nécessaire au changement conformationnel des TMDs.³⁸



Figure 11 : Structure d'un dimère de NBDs.³⁶ Les sous-domaines principaux sont colorés en gris et les sous-domaines hélicoïdaux sont colorés en vert.

A partir des données biochimiques, biophysiques et structurales à disposition, plusieurs modèles du cycle de l'hydrolyse de l'ATP ont été mis au point. Trois modèles se démarquent des autres, le modèle « **Switch** » développé par Higgins et Linton,^{37, 38} le modèle « **Constant contact** » développé par Jones et George⁵⁶ et, dans sa continuité, le modèle « **Reciprocating twin channel** ».⁵⁷ Nous nous focaliserons sur les mécanismes des exportateurs ABC.

II.3.1. Le modèle « Switch »

Le modèle « Switch »^{58, 59} suppose que le transport de substrat résulte d'une alternance de changements conformationnels des NBDs et TMDs. Le moteur du transport consiste en un « switch » on/off entre deux formes des NBDs, l'une étant un dimère fermé de NBDs à l'interface duquel deux molécules d'ATP sont intercalées ou « prise en sandwich », la

seconde étant une forme ouverte dissociée résultant de l'hydrolyse de l'ATP et de la libération d'ADP et de phosphate inorganique (P_i). Le passage de la forme fermée à la forme ouverte des NBDs induit un changement de conformation des TMDs qui facilite la translocation du substrat. A l'inverse, le passage de la forme ouverte à la forme fermée permet de réinitialiser le transporteur pour un prochain cycle de transport.

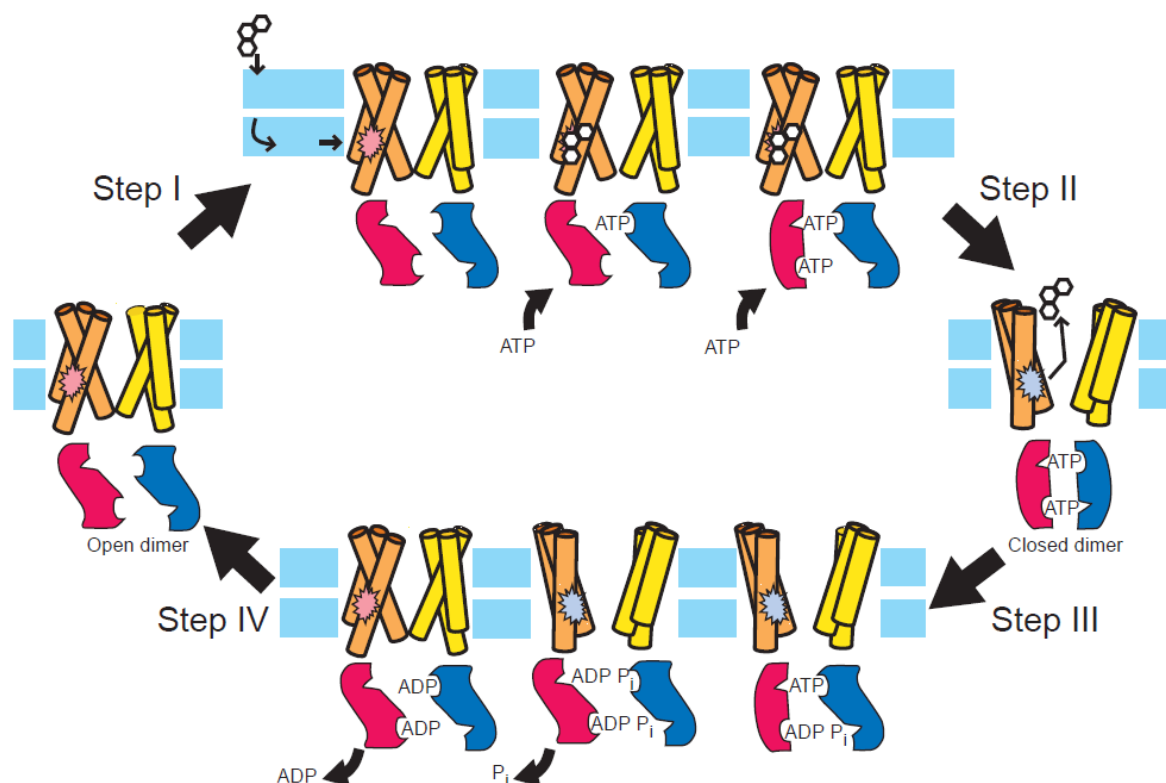


Figure 12 : Schéma représentant les étapes du modèle « Switch » du cycle de transport d'un exportateur ABC.⁵⁸
En jaune et orange sont représentés les deux TMDs et en rose et bleu les deux NBDs.

A l'état de repos, les NBDs sont dissociés et possèdent peu d'affinité pour l'ATP. Les TMDs (dont le site d'interaction avec le substrat est représenté en rouge sur la **Figure 12**) présentent une forte affinité avec le substrat. Les différentes étapes se déroulent de la manière suivante:

- *étape 1 :* le cycle de transport démarre par interaction entre le substrat et le site de haute affinité des TMDs. L'affinité des NBDs pour l'ATP augmente. Deux molécules d'ATP viennent alors se lier aux NBDs afin de former le dimère de NBDs. Cette étape peut légèrement varier selon les transporteurs ;
- *étape 2 :* la formation du dimère de NBDs induit un changement conformationnel des TMDs de telle sorte que le site de forte affinité avec le substrat se retrouve exposé au milieu extracellulaire, son affinité est donc réduite et le substrat est libéré ;

- *étape 3* : l'ATP est hydrolysée pour former un état de transition intermédiaire. Pour la plupart des transporteurs, l'hydrolyse des deux molécules d'ATP est séquentielle. Pour certains, uniquement une molécule d'ATP sera hydrolysée ;
- *étape 4* : le phosphate inorganique puis l'ADP sont libérés, permettant au transporteur de retrouver sa conformation initiale.

II.3.2. Le modèle « Constant contact »

Contrairement au modèle « Switch », le modèle « Constant contact » suppose que les deux NBDs restent constamment en contact. Les molécules d'ATP de chaque cavité seraient alternativement hydrolysées, le relargage de l'ATP et du phosphate inorganique s'effectuant dans un site ouvert pendant la réaction d'hydrolyse de la molécule d'ATP de l'autre site fermé et ainsi de suite.⁵⁶ L'un des sites s'ouvre suffisamment pour permettre la libération des nucléotides, ne nécessitant ainsi pas l'ouverture complète du dimère de NBDs. Puis ce site va interagir avec une molécule d'ATP puis se fermer tandis que le site opposé s'ouvrira pour relâcher l'ADP et le phosphate inorganique. Puis le cycle recommence (**Figure 13**).

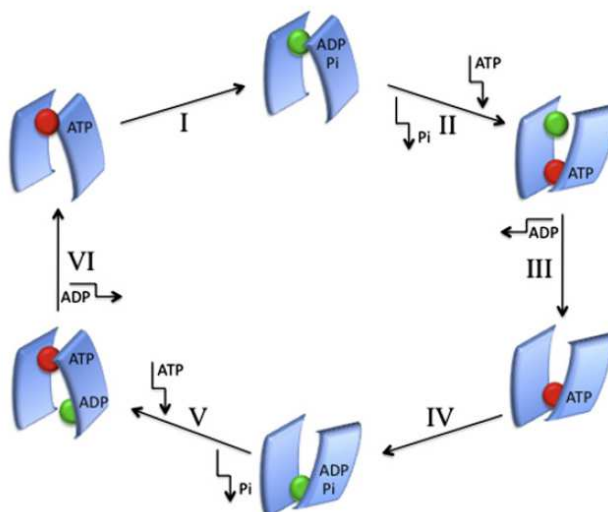


Figure 13 : Représentation du cycle catalytique d'hydrolyse de l'ATP selon le modèle « constant contact ».³⁶

Ces travaux se basent ainsi sur l'idée d'un fonctionnement en décalage à « 180° » des NBDs. Cette idée fut par la suite exploitée par la même équipe et appliquée à l'ensemble du transporteur pour conduire à un nouveau modèle : le modèle « reciprocating twin channel ».⁵⁷

II.3.3. Le modèle « Reciprocating twin channel »

Dans ce nouveau modèle, deux voies de translocation des substrats séparées fonctionnent de manière décalée et alternative au sein des TMDs, et de manière couplée avec les cycles catalytiques de l'hydrolyse de l'ATP au sein des NBDs. La séquence de liaison à l'ATP, de son hydrolyse, et de la libération des produits de l'hydrolyse dans chaque site actif des NBDs est directement couplée à la séquence analogue de liaison de substrat, translocation et libération du substrat au sein de l'une des deux voies de translocation au niveau des TMDs.

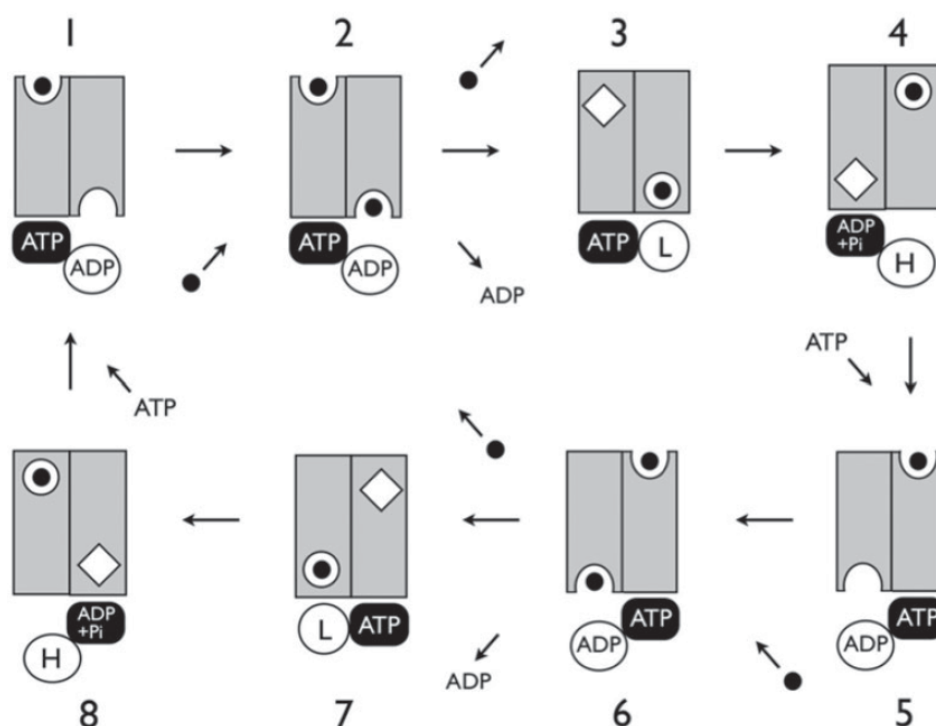


Figure 14 : Le modèle « Reciprocating twin channel » pour les exportateurs ABC.⁵⁷ Les TMDs sont représentés par des rectangles gris. La ligne verticale les démarquant sépare les deux voies de translocation, respectivement nommées voie 1 (à gauche) et voie 2 (à droite). Le point noir symbolise le substrat. Les sites de liaisons avec le substrat sont indiqués par des demi-cercles pour les conformations « inward-facing » et « outward-facing », par des cercles pour les états liés au substrat et séquestrés au sein de la voie de translocation, puis sous la forme d'un losange pour les états non liés à un substrat. Les sites actifs des NBDs sont représentés par un rond blanc pour les sites ouverts et par un ovale noir pour les sites occupés. Le site NBD de gauche se nomme site 1 et le site NBD de droite site 2. Les lettres L et H réfèrent respectivement à basse affinité et haute affinité pour l'ATP.

CHAPITRE 1. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

Les différentes étapes de ce mécanisme sont (**Figure 14**) :

- *étape 1* : le transporteur est sur le point de se lier à un substrat au niveau du site de haute affinité en conformation « inward-facing » de la voie 2. Le substrat transporté attend sa dissociation au niveau de la voie 1 ;
- *étape 2* : le substrat se lie au niveau de la voie 2, l'autre substrat est libéré de la voie 1 ;
- *étape 3* : l'ADP est libéré du site 2 des NBDs pour adopter une conformation de faible affinité avec l'ATP. Le substrat au sein de la voie 2 est séquestré du côté cytosolique de la membrane. Le transporteur est alors capable d'hydrolyser l'ATP ;
- *étape 4* : les produits de l'hydrolyse de l'ATP (ADP et Pi) dans le site 1 stabilisent la configuration dans laquelle le substrat dans la voie 2 est séquestré du côté extracellulaire de la membrane ;
- *étape 5* : la liaison de l'ATP au site 2 provoque une isomérisation du transporteur qui entraîne l'ouverture du site 1 relié à l'ADP, bloque l'ATP dans le site 2, régénère la conformation de haute affinité « inward-facing » de la voie 1, et présente le substrat transporté par la voie 2 au milieu extracellulaire.

Lors des étapes 6 à 8, les enchaînements se répètent réciproquement dans les voies 1 et 2 afin de compléter le cycle.

Pour conclure, le mécanisme moléculaire des transporteurs est encore peu connu bien que beaucoup étudié. Les différentes théories avancées font l'objet d'un grand nombre de controverses. En effet, les structures cristallographiques des deux transporteurs humains, P-gp murine et ABCB10 (**Figure 10**) indiquent que les NBDs passent par une forme ouverte, favorisant ainsi l'hypothèse du modèle « Switch ». Cependant, ces structures représentent les images des protéines figées et donc potentiellement différentes de leur comportement dynamique. Une étude récente par microscopie électronique souligne la flexibilité de ces transporteurs lors du processus de transport et démontre les très nettes différences existantes entre deux modèles, MsbA et P-gp.⁶⁰ Il est ainsi considéré comme acquis que les mécanismes de transport diffèrent entre les transporteurs ABC et d'autres études sont ainsi nécessaires afin d'étayer les différentes hypothèses.

II.4. PATHOLOGIES ASSOCIÉES AUX TRANSPORTEURS ABC HUMAINS

II.4.1. Les pathologies génétiques

Les transporteurs ABC humains sont impliqués dans l'export cellulaire d'un grand nombre de molécules incluant le cholestérol et les stérols, des lipides et des dérivés de l'acide rétinoïque, de l'acide biliaire, du fer, des nucléosides ou de peptides. L'altération du transport de l'une de ces substances conduit à un grand nombre de maladies génétiques (**Tableau 2**).

De plus, certains transporteurs ABC humains, exprimés dans la région du cerveau, sont impliqués dans la maladie d'Alzheimer. Les symptômes de cette maladie ont pour origine l'accumulation de peptides β -amyloïdes dans les cellules neuronales. Cette accumulation, issue d'un dérèglement de la formation ou de la dégradation de ces peptides, peut être due à certains transporteurs ABC impliqués de manière directe ou indirecte. Parmi ces transporteurs, on retrouve ABCA1/A2, ABCB1, ABCC1, ABCG1/G2/G4⁶¹ et plus récemment ABCA7.⁶²

Nom commun	Nomenclature HUGO	Maladie associée
ABC1	ABCA1	Maladie de Tangier ^{63, 64}
	ABCA3	Syndrome de la cataracte-microcornée ⁶⁵
ABCR	ABCA4	Maladie de Stargardt/ Dégénérescence maculaire liée à l'âge ⁶⁶
	ABCA12	Ichtyose congénitale ^{67, 68}
	ABCA13	Maladies psychiatriques ⁶⁹
TAP1/2	ABCB2/3	Immunodéficiences ^{70, 71}
SPGP/MDR2	ABCB4/B11	Cholestase intra hépatique familiale progressive ^{72, 73}
	ABCB6	Dyschromatose universelle héréditaire ⁷⁴
ABC7	ABCB7	Anémie sidéroblastique et ataxie ⁷⁵
MRP2	ABCC2	Syndrome de Dubin-Johnson ⁷⁶
MRP6	ABCC6	Pseudoxanthome élastique ⁷⁷
CFTR	ABCC7	Mucoviscidose ⁷⁸
SUR1/2	ABCC8/9	Hyperinsulinisme familial ^{79, 80}
ALD	ABCD1	Adréno-leucodystrophie ⁸¹
PMP70	ABCD3	Syndrome de Zellweger ⁸²
BCRP	ABCG2	Goutte ^{83, 84}
	ABCG5-G8	Sitostérolémie ^{85, 86}

Tableau 2 : Maladies génétiques associées aux transporteurs ABC.

II.4.2. Les transporteurs ABC impliqués dans le phénotype MDR

Certains transporteurs ABC sont largement exprimés dans le foie, le placenta et au sein de la barrière hémato-encéphalique où ils sont impliqués dans la détoxification contre des molécules organiques hydrophobes.⁸⁷ Cependant, lorsque ces transporteurs sont surexprimés au sein des membranes plasmiques des cellules cancéreuses, ils sont alors capables de transporter activement les agents anticancéreux, réduisant ainsi leur concentration intracellulaire et donc leur efficacité et conduisant à l'échec du traitement par chimiothérapie. Ce mécanisme de résistance a été décrit pour la première fois en 1973 par l'équipe de Dano qui a observé un transport massif de daunomycine au sein de cellules cancéreuses résistantes de l'ascite du carcinome d'Ehrlich.⁸⁸

Le premier transporteur impliqué dans le phénotype MDR identifié est la **glycoprotéine P**, appelée aussi P-gp, ABCB1 ou MDR, découvert par l'équipe de Juliano en 1976.⁸⁹ La seconde protéine identifiée est la protéine codant pour le gène ABCC1 appelée **Multidrug resistance associated protein 1** ou **MRP1** et découverte par l'équipe de Code en 1992.⁹⁰ Par la suite, tous les transporteurs appartenant à la sous-famille C, à l'exception d'ABCC6 et ABCC12 se sont révélés être impliqués dans le phénotype MDR.⁹¹ Pour finir, la dernière protéine à être impliquée dans le phénomène de chimiorésistance est la protéine **ABCG2** ou BCRP (Breast Cancer Resistance Protein) découverte par plusieurs équipes vers la fin des années 90.^{92, 93, 94}

II.4.3. Lutte contre la chimiorésistance due aux transporteurs ABC

Afin de contrecarrer la chimiorésistance induite par les transporteurs ABC, différentes stratégies thérapeutiques, ciblées, alternatives ou complémentaires aux traitements conventionnels ont vu le jour, avec plus ou moins de succès.

II.4.3.1 Le développement d'inhibiteurs des transporteurs ABC dans le but de resensibiliser les cellules cancéreuses résistantes

L'une des stratégies les plus directes et faciles à mettre en place afin de combattre le phénotype MDR est le développement de nouveaux modulateurs capables de bloquer l'efflux induit par les transporteurs ABC. Depuis 1980, de nombreux travaux se sont concentrés sur la

recherche de modulateurs actifs, sélectifs et peu toxiques des protéines ABC et en particulier sur la protéine P-gp.

Le premier agent découvert, capable d'inverser le phénotype MDR induit par la protéine P-gp, est le vérapamil, identifié en 1981 par l'équipe de Tsuruo (**Figure 15**).⁹⁵ Cet antagoniste calcique est en effet capable de sensibiliser à nouveau à la vincristine et à la vinblastine des cellules leucémiques P388 résistantes. L'année suivante, cette même équipe a démontré la capacité du vérapamil à restaurer la toxicité des *vinca*-alcaloïdes par augmentation de leur accumulation au sein des cellules résistantes.⁹⁶ Cependant, le vérapamil ne parvient pas à restaurer la sensibilité à la vinblastine lors des tests cliniques de phases I.⁹⁷ Quelques années plus tard, la capacité de la cyclosporine A, un agent immunosuppresseur, à resensibiliser à la vincristine et à la daunorubicine des cellules leucémiques lymphatiques humaines résistantes ainsi qu'à la doxorubicine des cellules du cancer des poumons résistantes est rapportée (**Figure 15**).⁹⁸ Cependant, tout comme le vérapamil, la cyclosporine A n'a pas donné de résultats probants lors des tests cliniques.^{99, 100}

Il sera découvert, plusieurs années plus tard, que la cyclosporine A est également capable d'inhiber l'activité de transport d'ABCG2 et de resensibiliser les cellules chimiorésistantes surexprimant ce transporteur.¹⁰¹

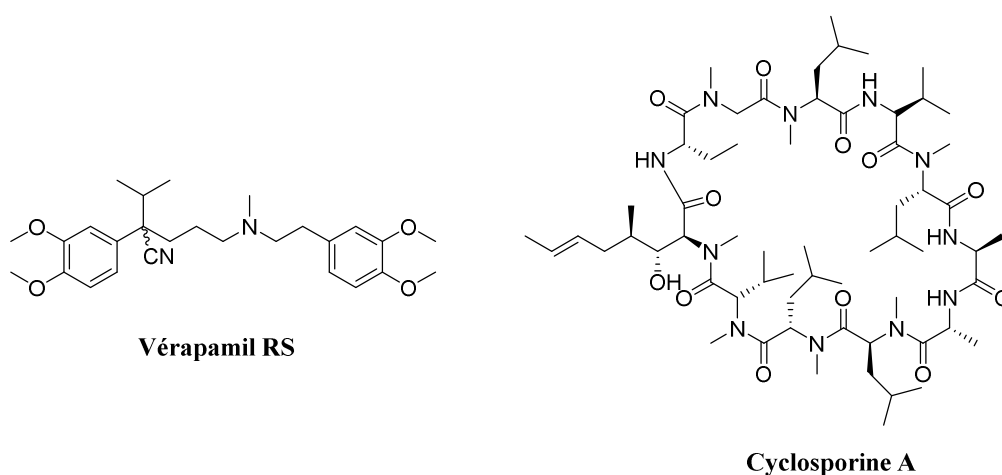


Figure 15: Structures du vérapamil RS et de la cyclosporine A.

Au-delà des résultats cliniques décevants, un problème de taille s'oppose à l'utilisation du vérapamil et de la cyclosporine A comme modulateurs de la MDR : leur activité pharmacologique propre qui peut engendrer des effets secondaires sévères.

Afin de maintenir l'effet chimiosensibilisant et diminuer les effets secondaires du vérapamil et de la cyclosporine A, d'autres dérivés ont émergé tels que le SDZ PSC833 (Valspodar), dérivé de la cyclosporine A et le S9788 dont la structure se base sur celle du vérapamil (**Figure 16**).^{102, 103} Cependant, malgré des résultats *in vitro* prometteurs, ces composés n'ont pas fourni de réponse clinique favorable.^{104, 105}



Elacridar (GF120918)

Tariquidar (XR9576)

Zosuquidar (LY335979)

Figure 17: Structures de l'élacridar, du tariquidar et du zosuquidar.

L'analyse de la littérature montre qu'à l'heure actuelle, seuls des inhibiteurs de la protéine P-gp ont atteint les tests cliniques. Les avancées biologiques et biochimiques réalisées sur les protéines MRP1 et ABCG2 et leurs structures ont ravivé l'intérêt suscité par la découverte de modulateurs ciblant MRP1 et ABCG2. Ainsi la recherche de nouveaux inhibiteurs actifs, sélectifs et non toxiques de transporteurs ABC reste encore d'actualité et d'un grand intérêt, en particulier pour ABCG2. En effet, la présence de cette protéine dans les cellules souches, impliquées dans certains cancers, en fait une cible biologique de choix.

II.4.3.2 Méthodes alternatives développées contre le phénotype MDR

Au vue de l'échec au stade clinique d'un grand nombre d'inhibiteurs de la protéine P-gp, de nouvelles méthodes ont vu le jour afin de contrecarrer la chimiorésistance. Un grand nombre d'entre elles ont pour cible l'ARN messager (ARNm). L'ensemble de ces techniques sont largement décrites dans la littérature.¹¹⁰ Parmi ces méthodes, on distingue :

- **les oligonucléotides antisens** : il s'agit de séquences d'acides nucléiques capables de se fixer sur le brin d'ARNm, permettant de stopper la synthèse de la protéine ciblée telle que la protéine P-gp. Cette méthode a permis de resensibiliser un carcinome humain à la doxorubicine en réduisant la synthèse de la P-gp ;
- **les ribozymes « Hammerhead »** : il s'agit de modules d'ARN pouvant catalyser une réaction de clivage à un site spécifique de l'ARN. Ceci aura pour objectif de réduire l'expression des transporteurs ABC ;
- **Les interférences sur les ARN** : les petits ARN interférents (siRNA) peuvent se lier spécifiquement à une séquence d'ARNm et ainsi empêcher l'expression de gènes en clivant cet ARN. Les siRNA ont déjà montré leur efficacité sur différents transporteurs ABC tels qu'ABCB1, ABCB4, ABCC2, ABCC3 et ABCG2. Les « short hairpin RNA » sont des brins d'ARN qui se replient sur eux-mêmes en formant une boucle en épingle à cheveux. Une fois sorti du noyau, le brin sens est dégradé et le brin antisens cible la séquence complémentaire de l'ARNm et entraîne le blocage de la traduction de la protéine. Cette technique a su faire ses preuves *in vitro* sur ABCB1, ABCC2 et ABCG2 mais également *in vivo* sur ABCB1.

D'autres méthodes ont également été développées telles que la régulation transcriptomique, l'altération de la membrane plasmique, l'encapsulation et les anticorps :¹¹⁰

- **la régulation transcriptomique** : différentes stratégies ont été développées afin d'altérer les voies de signalisation régulant l'expression des transporteurs ABC. La modulation de certains gènes, tels que LANCL2 impliqué dans l'augmentation de la

sensibilité des cellules cancéreuses à la doxorubicine en diminuant l'expression de la P-gp, permettrait de lutter contre la chimiorésistance due aux protéines ABC. De plus, les protéines kinases sont impliquées dans la régulation de l'expression des transporteurs ABC, telles que la protéine kinase C qui régule la P-gp. Il devient alors possible de diminuer l'expression des transporteurs en régulant l'activité de ces protéines kinases ;

- **l'altération de la membrane plasmique** : certains agents sont capables de modifier la membrane plasmique et ainsi prévenir la surexpression de la protéine P-gp ;
- **l'encapsulation** d'agents anticancéreux dans des liposomes, variant selon le type de cellules ciblées, est un moyen de contrecarrer le phénotype MDR. De plus, en supposant que les transporteurs ABC ne reconnaissent leur substrat que lors de leur passage à travers la membrane, l'utilisation de nanoparticules lipophiles capables d'entraîner le principe actif dans le cytoplasme puis de le relarguer permettrait d'éviter son efflux *via* les transporteurs ABC ;
- **les anticorps monoclonaux**, usuellement utilisés pour détecter les transporteurs ABC, peuvent également être capables de les inhiber. C'est le cas de UIC2 pour la protéine P-gp.¹¹¹

Un grand nombre des méthodes mentionnées précédemment a conduit à d'excellents résultats *in vitro*. Cependant, à l'heure actuelle, peu ont été testées *in vivo*. De plus, suite aux échecs des études cliniques sur les inhibiteurs de la protéine P-gp, pourtant très actifs *in vitro*, il est devenu nécessaire de trouver de nouvelles méthodes alternatives. Depuis plusieurs années, une nouvelle stratégie est en train d'émerger. Celle-ci se base sur l'hypersensibilité que développent les cellules cancéreuses chimiorésistantes lors des traitements par des agents anticancéreux.¹¹² Il devient alors possible de cibler et d'éliminer sélectivement les cellules chimiorésistantes surexprimant un transporteur ABC.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés aux protéines ABCG2 et MRP1 comme cibles. Le but ultime est de mettre au point de nouvelles molécules capables de sensibiliser les tumeurs résistantes aux traitements ou d'induire un effet cytotoxique ciblant sélectivement les cellules tumorales. Ces deux projets vont être développés dans les deux chapitres suivants. Dans un premier temps, après une introduction décrivant ABCG2 et son rôle dans la chimiorésistance, nous nous intéresserons à la conception, la synthèse et l'évaluation biologique de nouveaux inhibiteurs actifs, sélectifs et non toxiques d'ABCG2. Puis un travail de modélisation moléculaire sera décrit permettant de mieux comprendre les interactions entre la protéine et ses inhibiteurs.

CHAPITRE 1. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

Dans une deuxième partie, nous aborderons la conception, la synthèse et l'évaluation biologique de nouveaux modulateurs de MRP1 capables d'induire une sensibilité collatérale et ainsi la mort sélective par apoptose des cellules chimiorésistantes surexprimant la protéine.

C_{HAPITRE 2.}

**CONCEPTION, SYNTHÈSE, ACTIVITÉ
BIOLOGIQUE ET ÉTUDE COMPUTATIONNELLE
DE NOUVEAUX MODULATEURS DE LA PROTÉINE
ABCG2**

Avant-propos

L'un des deux axes principaux de cette thèse repose sur le développement de nouveaux inhibiteurs de la protéine ABCG2, fortement impliquée dans le phénotype MDR. Suite à la découverte au sein du laboratoire du **MBL-II-141**, un inhibiteur actif, sélectif et non toxique d'ABCG2, mon travail a consisté en la conception, la synthèse et l'évaluation biologique d'analogues du **MBL-II-141**, issus de différentes pharmacomodulations. Ceci a été réalisé dans le but, d'une part d'améliorer l'activité biologique, et d'autre part, d'étudier les relations structure-activité de ces ligands.

La totalité des synthèses a été effectuée au sein du Département de Pharmacochimie Moléculaire de Grenoble. Ce travail a été réalisé en étroite collaboration avec l'équipe du Dr. Attilio Di Pietro de l'Institut de Biologie et de Chimie des Protéines (IBCP) de l'Université Lyon 1 pour l'ensemble des tests *in vitro* sur les composés synthétisés ainsi qu'avec les docteurs Léa Payen et Mylène Honorat de l'Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université Lyon 1 pour les tests *in vivo* du **MBL-II-141**.

Après la découverte par nos collaborateurs biologistes de l'existence de plusieurs sites d'interaction entre ABCG2 et ses inhibiteurs, une seconde partie de ce projet de thèse a consisté en la construction, *via* le logiciel de modélisation moléculaire FLAP, de deux pharmacophores modélisant deux des sites d'interaction d'ABCG2. Ce travail a été réalisé au sein de la Section des Sciences Pharmaceutiques de l'Université de Genève en collaboration avec le Dr. Laura Goracci du Département de Chimie, Biologie et Biotechnologie de l'Université de Pérougia.

I. La protéine ABCG2 : structure, fonctions biologiques et implication dans le phénotype MDR.

I.1. STRUCTURE ET FONCTIONS BIOLOGIQUES D'ABCG2

I.1.1. Découverte de la protéine

Suite aux découvertes des transporteurs P-gp et MRP1, différentes études reportent une résistance induite par un nouveau transporteur sur des lignées cellulaires sélectionnées résistantes à la mitoxantrone. De plus, ces lignées cellulaires montrent une résistance à la doxorubicine et à l'étoposide mais aucune résistance à la vinblastine ni au cisplatine.^{113, 114} En 1998, Doyle et ses collègues sont les premiers à cloner ce transporteur à partir de lignées cellulaires issues du carcinome du sein (MCF7/AdVp) et le nomment BCRP pour *Breast Cancer Resistance Protein*.⁹² Simultanément à cette découverte, l'équipe d'Allikmets décrit un gène codant pour une protéine quasiment identique dans les cellules du placenta et le nomme ABCP pour *ABC transporter in placenta*.⁹³ Pour finir, l'équipe de Miyake en 1999 clone un gène codant pour une protéine responsable du phénotype de résistance à la mitoxantrone sur une lignée cellulaire de carcinome du colon. Ce gène est nommé MXR pour *mitoxantrone resistance gene*.⁹⁴ Étant le second membre de la sous famille G des transporteurs ABC, ce gène est par la suite nommé ABCG2.

I.1.2. Topologie et structure d'ABCG2

ABCG2 est un transporteur de 72 kDa constitué de 655 acides aminés.¹¹⁵ Deux caractéristiques uniques le distinguent des transporteurs P-gp et MRP1. En premier lieu, ABCG2 est un demi-transporteur composé uniquement d'un seul domaine transmembranaire (TMD) constitué de 6 hélices α transmembranaires et d'un seul domaine nucléotidique

CHAPITRE 2. MODULATION DE LA PROTÉINE ABCG2

cytoplasmique (NBD). Puis, ABCG2 possède une organisation inverse aux autres transporteurs. En effet, le TMD est du côté *C*-terminal tandis que le NBD est du côté *N*-terminal (**Figure 18**). Ces caractéristiques propres à ABCG2 indiquent que le mécanisme de transport de cette protéine diffère des protéines P-gp et MRP1.

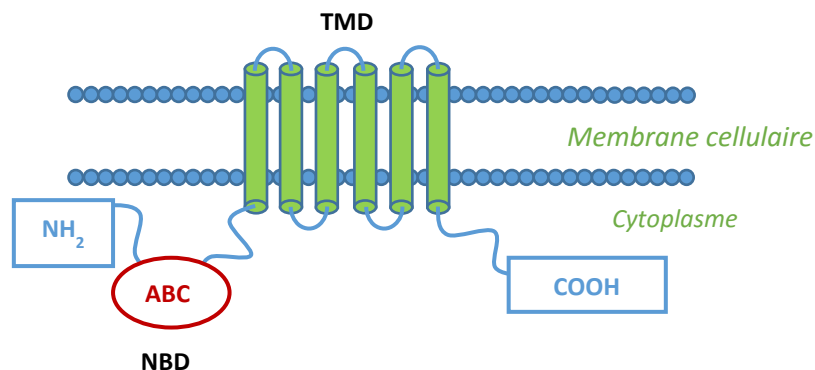


Figure 18 : Topologie générale d'ABCG2.

La structure 3D haute résolution de la protéine n'ayant pas encore été résolue, les modèles par homologie de séquence demeurent les seules structures utilisées dans l'interprétation des données expérimentales et dans la compréhension du mode d'action de la protéine. Ils ont été mis au point à partir de modèles existants et représentent différentes conformations de la protéine, chacune orientée vers l'espace intracellulaire, l'une ouverte sans substrat issue de la structure tridimensionnelle de MsbA d'*Escherichia coli*, la seconde fermée avec substrat, développée à partir du modèle de la P-gp murine (**Figure 19**).^{116, 117}

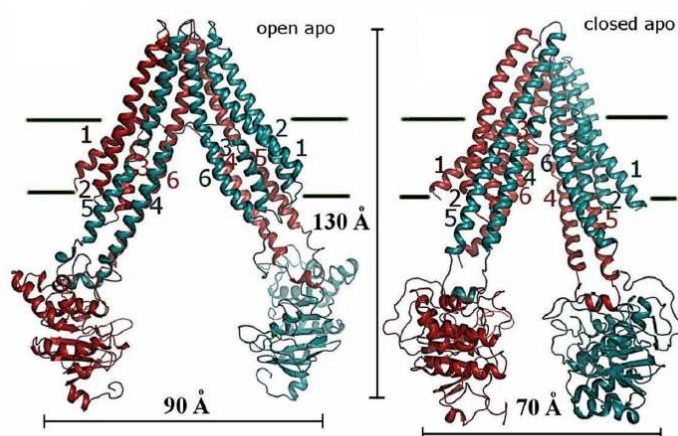


Figure 19 : Modèle d'ABCG2 construit par analogie, dans une conformation ouverte sans substrat (à gauche) issue de MsbA et dans une conformation fermée avec substrat (à droite) issue du modèle de la P-gp murine. Ces deux conformations sont orientées vers l'espace intracellulaire.¹¹⁷

I.1.3. La dimérisation

Comme nous l'avons vu précédemment, la présence d'au moins deux NBDs est nécessaire afin de permettre la liaison et l'hydrolyse de l'ATP pour assurer l'activité de transport d'ABCG2. La protéine doit ainsi au minimum s'homodimériser pour être active. L'équipe de Sarkadi en 2001 est la première à mettre en évidence cette hypothèse en démontrant qu'ABCG2 exprimée seule dans les cellules membranaires d'insectes Sf9 (cellules ovariennes de l'insecte *Spodoptera frugiperda*) est capable de fonctionner sans la présence de protéine partenaire, supposant ainsi l'hypothèse de la formation d'au moins un homodimère.¹¹⁸ L'année suivante, l'équipe de Kage confirme la formation d'homodimères d'ABCG2 pontés par des liaisons disulfures.¹¹⁹ Plus tard, l'étude réalisée par Xu et ses collaborateurs démontre la conformation sous forme d'oligomères d'ABCG2, pouvant aller jusqu'à une structure constituée de 12 monomères liés et dont la forme homotétramère est dominante.¹²⁰ Ceci est confirmé par les études de McDevitt qui décrivent une organisation en tétramères comportant quatre homodimères¹²¹ et celles de Dezi et Rosenberg qui observent une conformation sous la forme de tétramère majoritaire.^{117, 122} L'équipe de Ni démontre la formation de dimères/oligomères *in vivo* dans des cellules intactes par des études de transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (FRET).¹²³

Par la suite, plusieurs équipes se sont concentrées sur les acides aminés impliqués dans cette dimérisation/oligomérisation. Des études de mutagenèse dirigée ont mis en évidence l'implication de trois résidus cystéines, localisés au sein de la boucle extracellulaire ECL3 comprise entre TM5 et TM6. La **cystéine 603** (Cys₆₀₃) est impliquée dans la formation de ponts disulfures intermoléculaires au sein de l'homodimère d'ABCG2 mais n'est pas essentiel à l'expression de la protéine et à son bon fonctionnement. De plus, la présence unique de Cys₆₀₃ n'est pas suffisante pour assurer l'oligomérisation.¹²³ Deux autres résidus **cystéines** localisés aux positions **592** et **608** de l'ECL3 (Cys₅₉₂ et Cys₆₀₈) permettent la formation de ponts disulfures intramoléculaires influençant ainsi la spécificité du substrat de la protéine.¹²⁴⁻¹²⁶ Néanmoins, bien que ces liaisons covalentes disulfures soient nécessaires au maintien de la forme active d'ABCG2 en dimères/oligomères, il semblerait qu'elles ne soient pas essentielles pour assurer la fonction de transport de la protéine.¹²⁷

Pour finir, le **motif GXXXG**, présent au sein de TM1 est impliqué dans le maintien de la structure de la protéine ABCG2. En effet, la substitution d'un seul ou des deux résidus glycine par une leucine conduit à une perte de l'activité de transport de la rhodamine 123 ainsi qu'à

une diminution du transport de la mitoxantrone et de la prazosine-BODIPY. Néanmoins, il est intéressant de noter que la mutation avec un résidu alanine n'a aucune influence sur l'activité de transport. Il semble ainsi que le motif GXXXG joue un rôle dans la dimérisation d'ABCG2 et en particulier, dans l'arrangement correct des deux sites de liaisons à l'ATP.¹²⁸

I.1.4. Les résidus importants d'ABCG2

L'ensemble des études de mutagenèse dirigée réalisées sur les transporteurs ABC est détaillé dans la base de données ABCMdb (<http://abcmutations.hegelab.org>) créée par l'équipe de Gyimesi en 2012.¹²⁹ Cette base de données rassemble ainsi les mutations mettant en évidence les résidus acides aminés ainsi que les motifs structuraux responsables de l'activité de transport d'ABCG2 et de la reconnaissance de ses substrats. Un grand nombre de ces mutations a également été répertorié dans la revue de Szafraniec et ses collaborateurs en 2014.¹³⁰

Parmi les résidus mis en évidence, l'**arginine 482** (Arg₄₈₂) est un acide aminé essentiel pour la sélectivité des substrats d'ABCG2 et a fait l'objet d'un grand nombre d'études de mutagenèse. Des cellules sauvages d'ABCG2 avec Arg₄₈₂ ne transportent pas la daunorubicine et la rhodamine 123. Cependant, ces composés sont d'excellents substrats des mutants R482T et R482G.¹³¹ Le méthotrexate est un substrat uniquement des cellules sauvages d'ABCG2 tandis que la mitoxantrone, la prazosine-BODIPY et le colorant Hoechst 33342 sont des substrats de la lignée sauvage et des deux lignées mutantes.¹³² Arg₄₈₂ est localisée au sein de TM3, proche de l'interface cytoplasmique et fait partie de la poche d'interaction avec les substrats.

D'autres études de mutagenèse ont été réalisées sur différents résidus appartenant au domaine transmembranaire et sont également importants pour la fonction de transport d'ABCG2. Le résidu polaire **thréonine 402** (Thr₄₀₂) localisé dans TM1 joue un rôle important pour l'activité de transport de la protéine.¹³³ La **proline 485** (Pro₄₈₅), située dans TM3, introduit une flexibilité au sein de la poche d'interaction de la protéine pouvant contribuer à la spécificité du substrat.¹³⁴ De même, la mutation d'autres résidus tels que l'**acide glutamique 446** (Glu₄₄₆) localisé dans la boucle extracellulaire reliant TM1 et TM2,¹³⁵ la **leucine 554** (Leu₅₅₄) présente dans la boucle intracellulaire reliant TM4 et TM5¹¹⁹, la **lysine 86** (Lys₈₆) et l'**acide**

glutamique 211 (Glu₂₁₁) appartenant au domaine nucléotidique cytoplasmique,¹³⁶⁻¹³⁸ entraîne une perte de l'activité de transport.

Pour finir, comme nous l'avons vu précédemment, les **résidus cystéines 592, 603 et 608** sont impliqués dans la formation de l'homodimère d'ABCG2.^{124, 125}

I.1.5. Les substrats d'ABCG2

ABCG2 est connue pour transporter un large spectre de molécules thérapeutiques appartenant à des classes chimiques différentes, telles que les statines, les agents antibactériens, antinéoplasiques ou antiviraux, les inhibiteurs de la tyrosine kinase, les agents immunosuppresseurs ou encore les inhibiteurs nucléosidiques et non nucléosidiques de la transcriptase inverse. ABCG2 peut également transporter des molécules naturelles soulignant ainsi le rôle physiologique détoxifiant joué par la protéine. Par ailleurs, ABCG2 transporte également des anions organiques conjugués sulfatés^{139, 140} et glucuronidés¹⁴¹ tels que l'estrone-3-sulfate, ou le 17 β -estradiol-17-(β -D-glucoronide) (E₂17 β G). De manière générale, les composés conjugués sulfatés semblent être de meilleurs substrats que les dérivés conjugués au glutathion et au glucoronide. ABCG2 joue ainsi un rôle de détoxification et de régulation physiologique. Ce rôle a été mis en évidence *in vivo* par le transport de phyto-œstrogènes sulfatés *via* ABCG2.¹⁴²

Enfin, une variété de photosensibilisateurs, tels que le phéophorbide A ou la protoporphyrine IX sont également des substrats d'ABCG2 suggérant ainsi la responsabilité de la protéine dans la résistance cellulaire aux traitements par thérapie photodynamique.

Le **Tableau 3** rassemble une partie des substrats les plus connus d'ABCG2.

CHAPITRE 2. MODULATION DE LA PROTÉINE ABCG2

Types de composés	Substrats d'ABCG2
AGENTS ANTICANCÉREUX	Mitoxantrone, ¹³² Bisantrene, ³¹ Topotécan, ¹⁴³ Irinotécan, SN-38, ¹⁴⁴ Diflomotécan, ¹⁴⁵ Daunorubicine, ¹⁴⁶ Doxorubicine, ¹⁴⁷ Étoposide, ¹⁴⁸ Flavopiridol, ¹⁴⁹ Méthotrexate, ^{141, 150} Imatinib mésylate, ¹⁵¹ Gefitinib ¹⁵²
SUBSTRATS NATURELS	Estrone-3-sulfate, ^{139, 140} E ₂ 17βG, ¹⁴¹ Phéophorbide A, ¹⁵³ Protoporphyrine IX, ¹⁵³ acide urique, Vitamine B2, ¹⁵⁴ Resvératrol
FLUOROPHORES	Rhodamine 123, ^{132, 155} Hoechst 33342, ¹⁵⁶ Prazosine-BODIPY ¹³²

Tableau 3 : Liste non exhaustive des substrats connus d'ABCG2.

I.1.6. Localisation tissulaire et cellulaire d'ABCG2

ABCG2 est exprimée dans un grand nombre de tissus au sein de l'organisme. La plus forte expression de la protéine est observée au sein de la membrane apicale des tissus qui composent le placenta (syncytiotrophoblaste).¹⁵⁷ De plus, ABCG2 est exprimée dans la membrane apicale des cellules de l'intestin grêle et du foie,^{158, 159} au sein de la membrane apicale des *cellules* du rein¹⁶⁰ et au niveau de la vésicule biliaire.¹⁶¹ ABCG2 présente ainsi d'importants effets sur l'absorption et la biodisponibilité de nombreux xénobiotiques et de leurs métabolites. La protéine est également exprimée au sein des cellules endothéliales de la rétine impliquées dans la formation de la barrière hémato-rétinienne¹⁶² ainsi qu'au niveau des barrières hémato-encéphalique, placentaire et hémato-testiculaire dans le but de protéger respectivement le cerveau, le fœtus et les testicules.^{157, 163-166} La présence de la protéine au sein des cellules épithéliales alvéolaires des glandes mammaires, de l'utérus et de la vessie permet la sécrétion de nutriments. Pour finir, ABCG2 est présente au sein des cellules souches et des cellules progénitrices d'un grand nombre de tissus dans le but de protéger les cellules de l'attaque de certains xénobiotiques toxiques et cancérogènes.¹⁶³ La distribution d'ABCG2 au sein des tissus est représentée **Figure 20**.

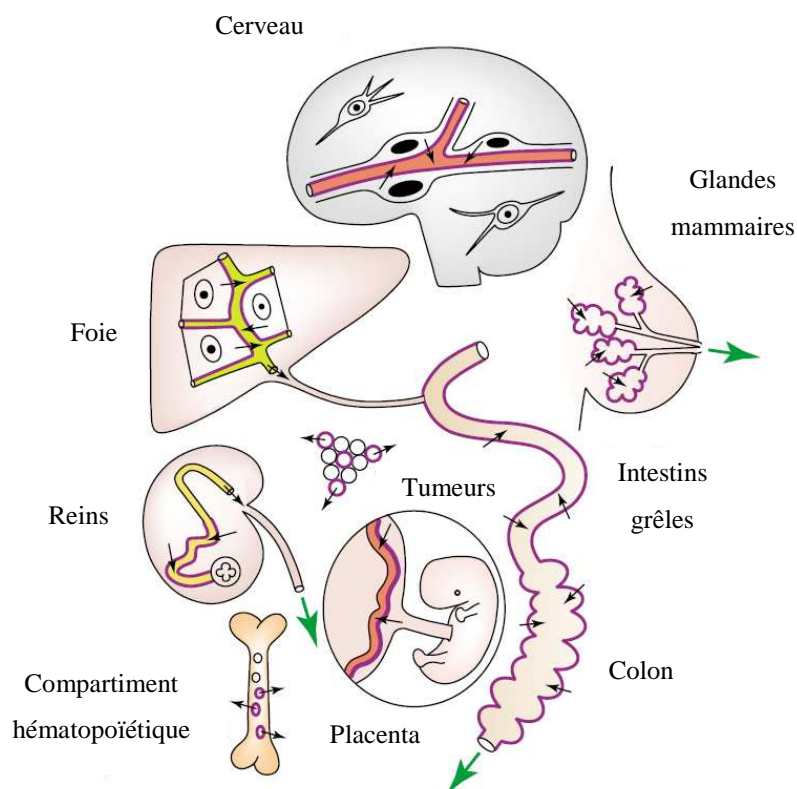


Figure 20 : Distribution d'ABCG2 au sein des tissus. La présence d'ABCG2 est indiquée par les lignes violettes. Les flèches noires indiquent la direction du transport des substrats par ABCG2. Les flèches vertes indiquent l'excrétion de ces substrats par l'organisme. (Figure adaptée des travaux de Van Herwaarden, 2006)¹⁶³

Contrairement à d'autres demi-transporteurs ABC localisés au niveau des membranes intracellulaires, ABCG2 est exprimée de manière prédominante au sein de la membrane plasmique du côté apical.¹⁶⁷⁻¹⁶⁹ D'autres études ont également démontré l'expression d'ABCG2 dans les lysosomes¹⁷⁰ et les mitochondries.¹⁷¹

I.1.7. Rôles physiologiques d'ABCG2

Du fait de sa large expression au sein de l'organisme et de sa capacité à transporter un grand nombre de substrats, ABCG2 est impliquée dans un grand nombre de processus biologiques détaillés au sein de différentes revues.^{164, 165, 172, 173}

1.1.7.1 La première ligne de défense contre les xénobiotiques

ABCG2, fortement exprimée au sein des cellules du tractus intestinal, joue un rôle majeur dans l'absorption et la biodisponibilité des xénobiotiques et permet ainsi d'assurer une première ligne de défense contre ces composés issus de médicaments ou de toxines.

Des études sur l'absorption et la biodisponibilité du topotécan, substrat d'ABCG2, en présence de GF120918, inhibiteur d'ABCG2, réalisées chez la souris KO (*knock out*) pour le gène *Mdr1a*¹⁷⁴ puis chez l'humain,¹⁷⁵ soulignent l'implication de la protéine dans la limitation de l'absorption et dans l'excrétion du topotécan.

ABCG2 permet également à l'organisme de se défendre contre certaines toxines présentes dans notre alimentation, telles que le phéophorbide a, dérivé de la chlorophylle¹⁵³ ou encore certains carcinogènes tels que PhIP (2-amino-1-méthyl-6-phénylimidazo[4,5-b]pyridine),¹⁷⁶ IQ (2-amino-3-méthylimidazo[4,5-f]quinoline), Trp-P-1 (3-amino-1,4-diméthyl-5H-pyrido[4,3-b]indole) et l'aflatoxine B1.¹⁷⁷

1.1.7.2 Rôle d'ABCG2 au sein du placenta

ABCG2 est très fortement exprimée au sein de la membrane apicale des syncytiotrophoblastes qui composent le placenta. D'autres transporteurs ABC, tels que la P-gp et MRP2 y sont également exprimés.¹⁵⁷ Les cellules du syncytiotrophoblaste constituent une barrière entre les circulations sanguines du fœtus et de la mère et constituent le passage de divers nutriments. ABCG2, exposée du côté maternel, est ainsi impliquée dans le transport de différentes drogues et toxines de la circulation sanguine fœtale vers celle de la mère permettant ainsi la protection du fœtus. Ceci est démontré par plusieurs études sur souris KO du gène *Abcg2* étudiant l'exposition fœtale au topotécan et aux toxines issues de l'alimentation maternelle.^{178,}

179

1.1.7.3 Rôle d'ABCG2 au sein de la barrière hémato-encéphalique

ABCG2 est exprimée dans la membrane apicale des cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique.¹⁸⁰⁻¹⁸² Elle y joue un rôle de protection, limitant la pénétration dans le cerveau de composés anticancéreux, réduisant ainsi leur efficacité.^{183, 184} C'est le cas de l'imatinib dont la pénétration dans le cerveau est considérablement augmentée chez les souris KO du gène *Abcg2*.¹⁸⁵ Toutefois, son importance reste encore peu connue par rapport à la P-

gp, principal transporteur impliqué dans la limitation de la pénétration de xénobiotiques dans le cerveau (**Figure 21**).

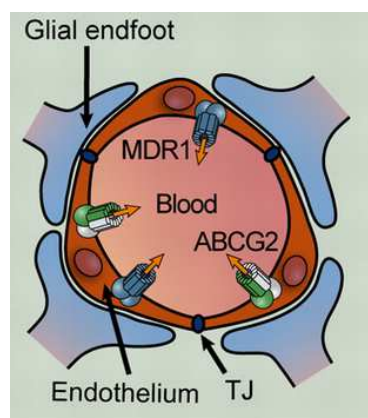


Figure 21 : Rôle joué par ABCG2 au sein de la barrière hémato-encéphalique.¹⁷² Les cellules endothéliales sont connectées *via* des jonctions étroites (TJ pour *tight junction*) et constituent une barrière empêchant les composés hydrophiles de pénétrer dans le cerveau. Les agents hydrophobes et les toxines sont capables de franchir cette barrière. La présence des transporteurs P-gp et ABCG2, exprimés dans la membrane apicale des cellules endothéliales (vers le compartiment sanguin) est responsable du transport d'une large variété de ces composés.

1.1.7.4 ABCG2 au sein des cellules souches

ABCG2 est fortement exprimée au sein des cellules souches et en particulier au sein des cellules souches hématopoïétiques définissant la « *side population* » (SP), caractérisée par leur capacité à effluer le colorant fluorescent Hoechst 33342. Plusieurs études démontrent qu'ABCG2 est capable de transporter activement Hoechst 33342. Ainsi ABCG2 définit le phénotype SP au sein des cellules souches hématopoïétiques.^{156, 186, 187} Lors de la différenciation des cellules, l'expression d'ABCG2 diminue, faisant ainsi d'ABCG2 un marqueur efficace des cellules souches.¹⁸⁶ De plus ABCG2 joue un rôle de protection des cellules souches. D'une part, la protéine permet de protéger les cellules contre certains agents cytotoxiques tels que la mitoxantrone.¹⁸⁸ D'autre part, ABCG2 participe à la survie des cellules souches en conditions d'hypoxie en permettant le transport d'hèmes (porphyrines impliquées dans le transport de l'oxygène et la respiration cellulaire au sein de l'hémoglobine) et en évitant ainsi leur accumulation délétère.¹⁸⁹ Néanmoins, malgré ce rôle de protection, il est intéressant de noter qu'ABCG2 n'intervient pas directement dans la fonction et la différenciation des cellules souches.¹⁸⁸

I.1.7.5 Rôle d'ABCG2 au niveau des glandes mammaires

ABCG2 est fortement exprimée au sein de la membrane apicale des cellules épithéliales alvéolaires des glandes mammaires des souris, des vaches et des humains en période de lactation. En effet, cette expression augmente pendant la période de gestation, atteint son maximum lors de la lactation puis diminue rapidement au moment du sevrage.¹⁹⁰ Les cellules épithéliales alvéolaires étant le principal lieu de production de lait, plusieurs études démontrent la responsabilité d'ABCG2 dans la sécrétion de xénobiotiques et toxines tels que l'agent carcinogène PhIP, l'agent anticancéreux topotécan, la cimétidine utilisée dans le traitement de l'ulcère,¹⁹⁰ l'antibiotique nitrofurantoïne¹⁹¹ ou sous la forme de fluoroquinolones.¹⁹²

ABCG2 est également impliquée dans le transport de la riboflavine (vitamine B2) dans le lait, nutriment important dans la croissance du nourrisson. Cependant, des études montrent que des souris KO pour le gène *Bcrp1* se développent correctement.¹⁹⁰ Le rôle physiologique d'ABCG2 au niveau de glandes mammaires reste encore en partie incompris.

I.1.8. Les pathologies associées à ABCG2

I.1.8.1 La goutte

La goutte est une maladie chronique liée à un taux anormalement élevé d'acide urique dans le sang (hyperuricémie). L'acide urique est l'un des déchets produit naturellement par l'organisme. Néanmoins, en cas d'excédent, il se dépose graduellement sous forme de cristaux, entre autre dans les articulations, la peau et les reins, conduisant à des arthrites inflammatoires, des néphropathies et des calculs rénaux. L'hyperuricémie est également liée à d'autres maladies telles que des maladies vasculaires, des maladies chroniques rénales et le diabète.

ABCG2 est exprimée au sein de la membrane apicale des cellules épithéliales au niveau des reins¹⁶⁰ et est capable de transporter activement l'acide urique contribuant ainsi à sa sécrétion.¹⁹³ Selon différentes études, des mutations au sein d'ABCG2 (Q126X et Q141K) seraient à l'origine d'un dysfonctionnement du transport de l'acide urique entraînant ainsi une élévation du niveau d'acide urique et donc la goutte.¹⁹⁴ En effet, d'après Woodward en 2009, 10% des cas de goutte seraient imputables à la variation Q141K d'ABCG2.¹⁹⁵ Cette mutation

entraînant, comme nous l'avons vu précédemment, une perte de l'activité de transport, elle peut en effet être la cause de l'accumulation de l'acide urique dans le sang. Des études récentes suggèrent que dans les cas d'accumulation d'acide urique, l'implication d'ABCG2 ne se fait pas au niveau des reins, mais plutôt au niveau des intestins.¹⁹⁶ En effet, des études montrent que les souris KO pour le gène *Abcg2* présentent une sécrétion rénale d'acide urique élevée au niveau des reins mais considérablement diminuée au niveau des intestins suggérant ainsi que le dysfonctionnement d'ABCG2 et l'accumulation d'acide urique sont liés à la diminution de la sécrétion intestinale.¹⁹⁷

1.1.8.2 Les maladies neurodégénératives

Parmi les transporteurs ABC, pas moins de treize, dont ABCG2, sont impliqués dans le transport de lipides au sein du cerveau et contribuent ainsi à certaines maladies neurodégénératives, en particulier la maladie d'Alzheimer. L'une des caractéristiques de cette pathologie est l'accumulation et la déposition de peptides amyloïdes Beta ($A\beta$) sous forme de plaques séniles au sein du cerveau. Les peptides $A\beta$ étant activement transportés à travers la barrière hémato-encéphalique,¹⁹⁸ de nombreuses études suggèrent l'implication des transporteurs ABC, localisés au sein des cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique, dans la maladie d'Alzheimer. En effet, tout comme la P-gp, ABCG2 agit tel un « gardien » empêchant les peptides $A\beta$ de pénétrer dans le cerveau *via* la barrière hémato-encéphalique.¹⁹⁹ Ce rôle fut confirmé *in vitro* et *in vivo* démontrant la capacité d'ABCG2 à restreindre l'accès des peptides $A\beta$ du sang au cerveau tout en leur permettant d'être transportés dans le sang.^{200, 201} De plus, il apparaît qu'ABCG2 est capable de contrôler le niveau de peptides $A\beta$. Ainsi l'altération de son expression ou de son activité fonctionnelle pourraient être à l'origine de l'agrégation de ces peptides au sein des cellules endothéliales du cerveau et donc conduire à un risque accru de développement de la maladie d'Alzheimer.^{202,}

203

1.1.8.3 La chimiorésistance

Étant capable de transporter un grand nombre d'agents anticancéreux, tout comme les protéines P-gp et MRP1, de nombreuses études se sont portées sur le rôle joué par ABCG2 dans le phénotype MDR. Ces travaux font souvent l'objet de controverses.^{204, 205}

Cette implication semble apparaître au sein des tumeurs solides humaines.^{206, 207} En effet, la chimiorésistance due à la surexpression d'ABCG2 a déjà été observée pour différents agents anticancéreux tels que la mitoxantrone, le topotécan, le flavopiridol ou l'imatinib et ne semble pas être dépendant de l'expression de la P-gp et de MRP1.²⁰⁸

Un grand nombre de ces études porte en particulier sur le rôle joué par ABCG2 dans les leucémies myéloïdes aigües (AML) et souligne les nombreux désaccords à ce sujet. Alors que certaines attestent de l'expression d'un fort taux d'ABCG2, d'autres, au contraire, n'en détectent pas une trace.²⁰⁹⁻²¹³ Cette maladie est considérée comme une maladie des cellules souches, due à une éradication incomplète des cellules souches leucémiques CD34+/CD38-. Ainsi, en raison de son rôle de protection, ABCG2 est fortement impliquée dans le développement de la résistance de ces cellules souches leucémiques.²¹⁴

Ainsi ABCG2 joue un rôle important dans la formation et la prolifération des cellules souches cancéreuses. De plus, étant un marqueur de ces cellules souches, ABCG2 semble présenter de nombreuses applications potentielles dans la thérapie des cellules souches et des tumeurs.²¹⁵

I.2. LA PROTÉINE ABCG2 COMME CIBLE BIOLOGIQUE DANS LE TRAITEMENT DE LA CHIMIORÉSISTANCE

I.2.1. Inhibition de la protéine ABCG2

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, la chimiorésistance est actuellement un problème majeur auquel se heurtent les traitements chimiothérapeutiques. Il devient ainsi urgent de trouver de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblées, alternatives ou complémentaires aux traitements actuels.

Plusieurs approches thérapeutiques peuvent être utilisées afin d'inverser le phénotype MDR liés aux transporteurs ABC. ABCG2 étant l'un des transporteurs impliqués dans ce phénomène, l'une de ces stratégies consiste à bloquer l'efflux d'agents anticancéreux afin d'augmenter leur concentration intracellulaire et donc leur efficacité. Ainsi l'association d'un inhibiteur d'ABCG2 à un agent anticancéreux permettra de rendre à nouveau sensibles les cellules cancéreuses au traitement et ainsi de potentialiser l'effet du médicament.

N'ayant pas encore à disposition la structure cristalline 3D d'ABCG2, une première difficulté consiste en l'impossibilité d'utiliser, à l'heure actuelle, une approche rationnelle afin de concevoir de nouveaux inhibiteurs. Une seconde difficulté provient de la large variété chimique et structurale des substrats d'ABCG2. Ainsi, afin de découvrir de nouveaux inhibiteurs actifs, sélectifs et non toxiques, il est nécessaire de cribler un grand nombre de molécules afin d'identifier des composés dits chefs de file et de réaliser différentes pharmacomodulations afin d'optimiser l'activité inhibitrice d'une part et de mieux comprendre les relations structure-activité d'autre part.

I.2.2. Inhibiteurs connus d'ABCG2

Depuis sa découverte, différentes générations d'inhibiteurs d'ABCG2, de structures chimiques très différentes, ont été mis au point

De nombreux inhibiteurs de la protéine P-gp s'avérant inhiber également ABCG2, l'une des premières stratégies mise en place a été le développement de nouveaux inhibiteurs spécifiques et non compétitifs d'ABCG2 à partir d'inhibiteurs connus de la P-gp. Il s'agit des inhibiteurs de première génération. En effet, les études de l'élacridar (GF120918) et du tariquidar (XR9576) ont révélé que ces inhibiteurs connus de la P-gp étaient également capables d'inhiber ABCG2.²¹⁶ On peut également citer d'autres inhibiteurs tels que la cyclosporine A, le tacrolimus ou le sirolimus, agents immunosuppresseurs découverts en 1970 (**Figure 22**).¹⁰¹

217

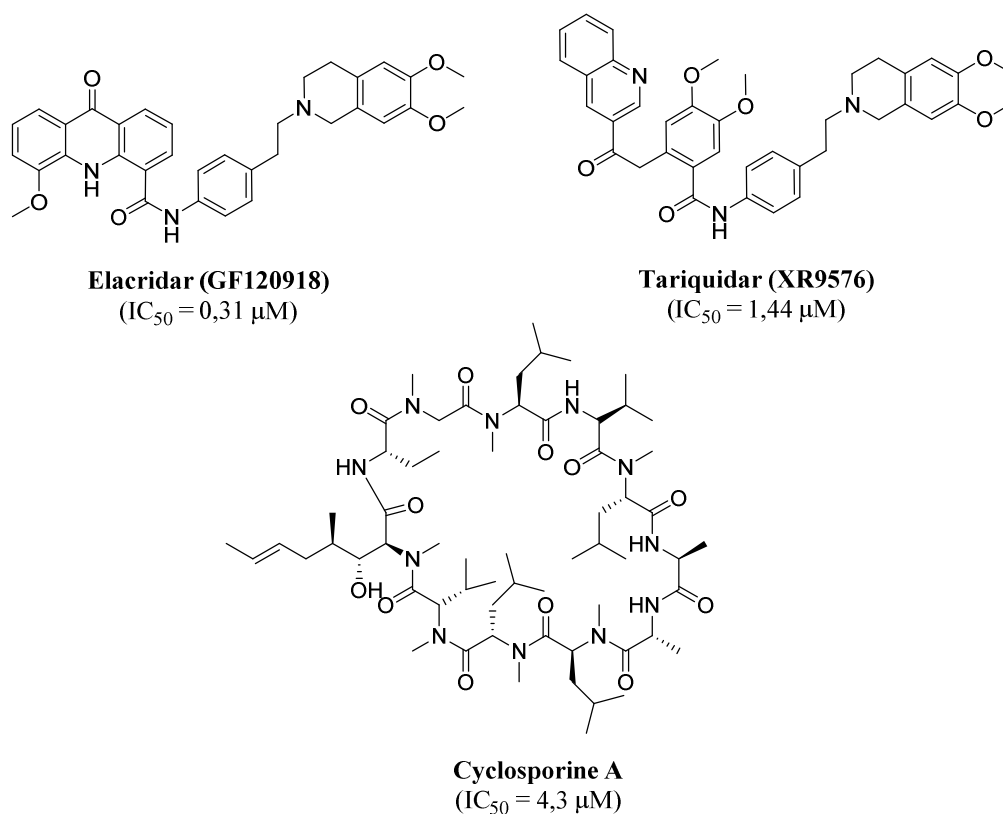


Figure 22 : Inhibiteurs d'ABCG2 de 1^{ère} génération.

La seconde génération d'inhibiteurs d'ABCG2 comprend les analogues de la Fumitremorgin C (FTC).^{218, 219} La FTC est le premier inhibiteur sélectif d'ABCG2 isolée d'*Aspergillus fumigatus*. Cependant sa neurotoxicité ne lui permet pas d'atteindre le stade clinique. Afin de s'affranchir de cette toxicité, des analogues indolyldicétopipérazines ont été mis au point. Parmi eux on peut citer la trysprostatine A²²⁰ ou encore le Ko143 qui se révèle être un excellent inhibiteur *in vitro*, malgré une faible cytotoxicité résiduelle (**Figure 23**).^{221, 222}

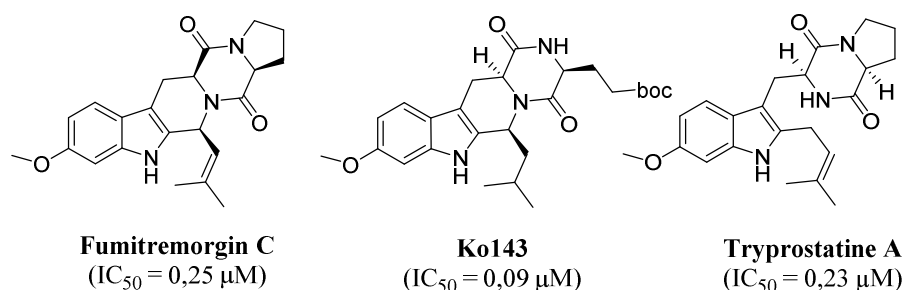


Figure 23 : Inhibiteurs d'ABCG2 de 2^{nde} génération.

CHAPITRE 2. MODULATION DE LA PROTÉINE ABCG2

La troisième génération rassemble des dérivés de flavonoïdes,²²³ des roténoïdes naturels²²⁴ et des inhibiteurs de kinase²²⁵ qui se sont révélés être des inhibiteurs d'ABCG2 malgré le manque de sélectivité et/ou des problèmes de toxicité (**Figure 24**).

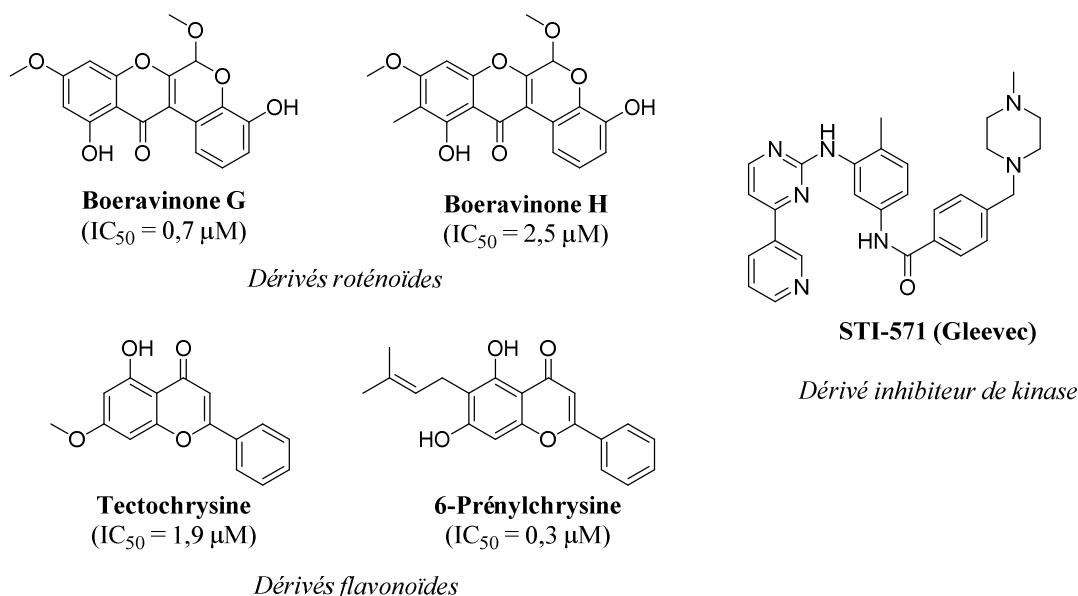


Figure 24 : Inhibiteurs d'ABCG2 de 3^{ème} génération.

De plus, des dérivés issus de série pipérazinochromones *N*-substituées, tels que le 2-(4-*n*-butylpipérazin-1-ylcarbonyl)-5-hydroxychromone (**4c**) ou issus de série des phénylalkylaminobenzopyranones tels que la 2-[*N*-(4-méthoxyphényléthylaminocarbonyl)]-5-hydroxychromone (**5b**) et la 2-[*N*-(3,4-diméthoxyphényléthylaminocarbonyl)]-5-hydroxychromone (**5c**), se sont également révélés être des inhibiteurs d'ABCG2 (**Figure 25**).²²⁶

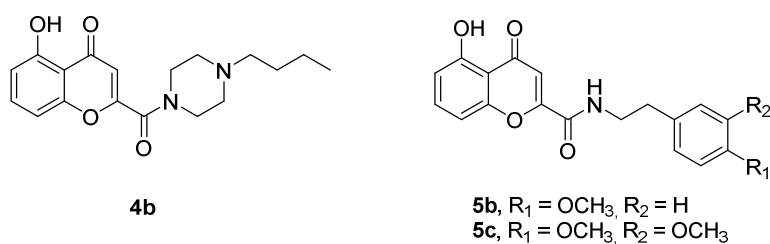


Figure 25 : Structures des inhibiteurs **4b**, **5b** et **5c**.

La dernière génération est une série de composés issus de modulations chimiques de molécules connues pour leur affinité envers les protéines MDR. Il s'agit de molécules actives et sélectives d'ABCG2. Parmi ces composés, on retrouve des dérivés méthoxy-stilbènes,²²⁷ des dérivés sélectifs du tariquidar²²⁸ et des dérivés de chalcones (**Figure 26**).^{229, 230}

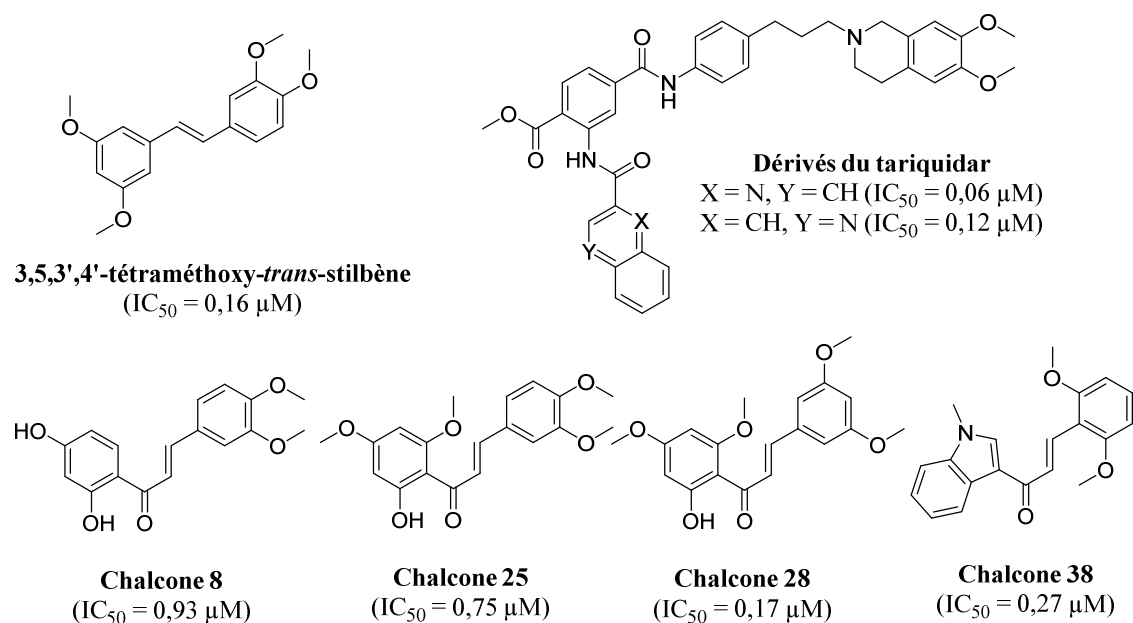


Figure 26 : Inhibiteurs d'ABCG2 de 4^{ème} génération.

Ces dernières années, de nouveaux inhibiteurs ont été mis au point tels que des indéno[1,2-*b*]indole issus d'inhibiteurs de la protéine kinase CK2,²³¹ des dérivés du HM3018, inhibiteur de la P-gp,²³² des dérivés quinazolines,²³³ des chalcones substituées avec un groupement quinoxaline²³⁴ et des chalcones symétriques (Figure 27).²³⁵

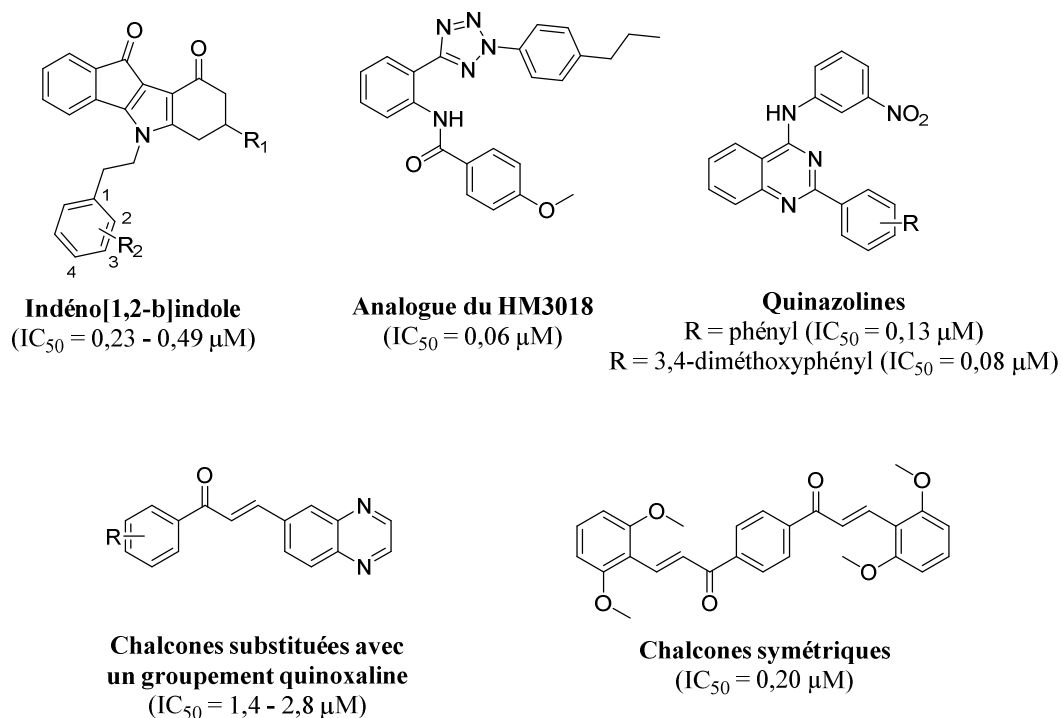


Figure 27 : Récents inhibiteurs d'ABCG2.

Cependant, malgré les efforts mis en place afin de trouver de nouveaux inhibiteurs actifs d'ABCG2, des problèmes de sélectivité et de toxicité subsistent. Des travaux menés antérieurement au sein du laboratoire ont conduit à la synthèse de nouveaux inhibiteurs actifs et sélectifs d'ABCG2.

I.2.3. Travaux antérieurs au sein du laboratoire

Depuis maintenant plusieurs années, le laboratoire concentre une partie de ses recherches sur la conception et la synthèse de nouveaux inhibiteurs actifs, sélectifs et non toxiques d'ABCG2 afin de contrecarrer le phénotype MDR.

Différents travaux ont été réalisés sur des dérivés acridones dérivant de l'élacridar (GF120918), inhibiteur connu de la P-gp et d'ABCG2. Un composé, le **MBL-I-87**, s'est révélé *in vitro* être un inhibiteur aussi actif que l'élacridar envers l'efflux de l'irinotécan et de plus, spécifique à ABCG2 (**Figure 28**).²³⁶

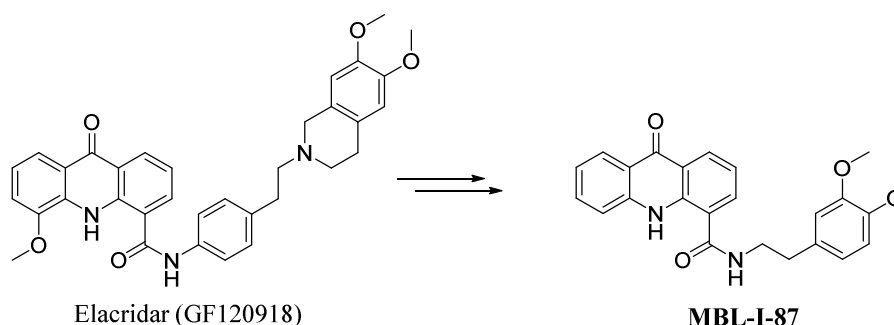


Figure 28 : Structure du **MBL-I-87**, dérivé de l'élacridar.

Ce dérivé a été testé *in vivo* sur des souris SCID xénotreffées par des cellules embryonnaires humaines du cancer du rein (HEK293) transfectées surexprimant la protéine ABCG2 et porteuses de tumeur.²³⁷

Remarque : la transfection est un processus de transfert de gènes au sein de cellules eucaryotes auxquelles on introduit un matériel génétique exogène. Dans la suite de ce manuscrit, on distinguera les cellules transfectées des cellules sélectionnées issues de la sélection cellulaire, processus de sélection de cellules présentant des traits spécifiques parmi un groupe de cellules génétiquement différentes. Les cellules sélectionnées se rapprochent plus du cas réel pour le traitement d'un patient qui se heurte à une chimiorésistance.

Le **MBL-I-87** s'est révélé être capable de potentialiser l'effet de l'irinotécan. En effet, comme l'indique la **Figure 29**, après 20 jours environ, la croissance tumorale est retardée par la co-administration de **MBL-I-87** avec l'irinotécan (cercles vides) en comparaison au traitement avec l'irinotécan seul au sein d'une suspension colloïdale (cercles pleins).²³⁷

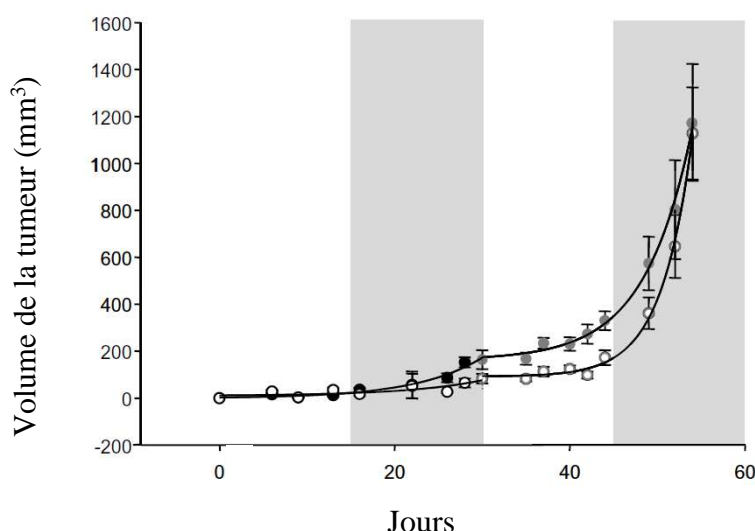


Figure 29 : Évolution de la croissance de la tumeur chez des souris xéno greffées par des cellules surexprimant ABCG2 traitées avec le **MBL-I-87** (2,4 mg/kg) dans une suspension colloïdale en association avec de l'irinotécan (30 mg/kg) (cercles vides) et avec une suspension colloïdale sans **MBL-I-87** (NANO) en association avec l'irinotécan (cercles pleins). L'expérience comprend quatre périodes : une première période de traitement (14 jours) suivie d'une période de repos (14 jours) (cercles noirs) puis une seconde période de traitement suivie d'une deuxième période de repos (cercles gris). L'expérience a été menée sur 8 animaux.

Cependant, les noyaux acridones sont connus pour être des intercalants de l'ADN, rendant ainsi le **MBL-I-87** toxique aux doses utilisées en chimiothérapie (30% de cytotoxicité à 5-10 μ M).²²³ Malgré tout, cette étude est la première démontrant *in vivo* l'efficacité d'un inhibiteur ABCG2 et a incité le laboratoire à poursuivre la recherche de nouveaux inhibiteurs actifs, sélectifs et non toxiques d'ABCG2.

I.2.4. Le MBL-II-141, meilleur inhibiteur mis au point à ce jour

Suites aux résultats de toxicité observés pour le **MBL-I-87** à de fortes concentrations, des études de relation-structure activité ont été poursuivies. L'une des thématiques du laboratoire étant la synthèse de flavonoïdes, composés d'origine naturelle et connus pour leur faible cytotoxicité, de nouvelles séries de composés ont été synthétisées, en remplaçant le noyau acridone par un noyau chromone. Différents analogues ont été synthétisés puis évalués

CHAPITRE 2. MODULATION DE LA PROTÉINE ABCG2

biologiquement.²³⁸ L'ensemble de ces composés a été testé à deux concentrations (1 μM et 5 μM) vis-à-vis de l'efflux de la mitoxantrone. Pour les meilleurs composés présentant 100% d'inhibition, une IC_{50} a été déterminée. Parmi eux, un dérivé, le 5-(4-bromobenzoyloxy)-2-((5-méthoxyindol-3-yl)-éthylaminocarbonyl)-chromène-4-one ou **MBL-II-141** (**Figure 30**) s'est révélé être un inhibiteur actif, sélectif et non toxique d'ABCG2. Il s'agit du meilleur inhibiteur mis au point à ce jour.

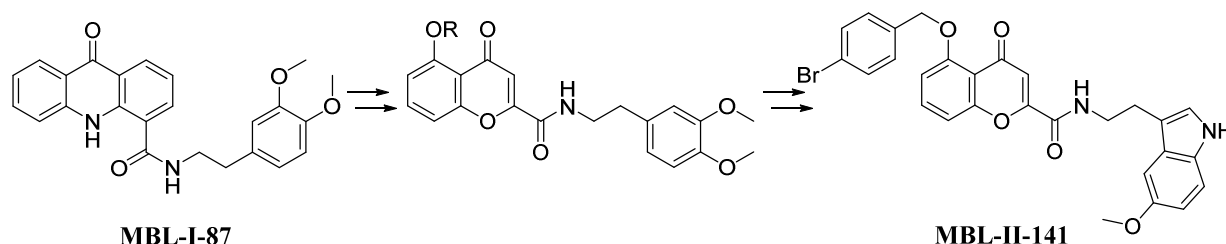


Figure 30 : Structure du **MBL-II-141** et de ses précurseurs.

Le **MBL-II-141** présente une IC_{50} de 0,11 μM pour l'inhibition de l'efflux de la mitoxantrone sur des cellules transfectées surexprimant ABCG2 (HEK293-ABCG2).²³⁹ Il est sélectif vis-à-vis des protéines P-gp et MRP1. En effet, alors que le **MBL-II-141** présente un pourcentage d'inhibition de 100% pour l'efflux de la mitoxantrone *via* ABCG2 à 5 μM , il ne présente aucune inhibition ni de l'efflux de la mitoxantrone pour la P-gp, ni de l'efflux de calcéine-AM pour MRP1. Cette sélectivité n'est en particulier pas observée pour les inhibiteurs de référence d'ABCG2, tels que l'élacridar (GF120918) ou le tariquidar (XR9576).

Le **MBL-II-141** est également très peu cytotoxique. On observe moins de 25% de mort cellulaire sur les cellules HEK293 contrôles et surexprimant ABCG2 à 100 μM , concentration équivalent à 100 fois la dose active (**Figure 31**). Ce composé est donc bien moins cytotoxique que le **MBL-I-87**.

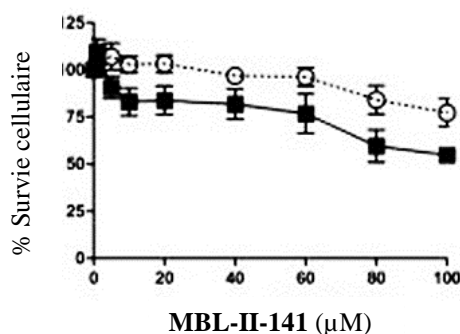


Figure 31 : Résultats issus du test de survie cellulaire (test au MTT) du **MBL-II-141** sur les cellules HEK293 surexprimant ABCG2 (■) et sur les cellules HEK293 contrôle (○) pour un traitement de 72 h.²³⁹

L'index thérapeutique du **MBL-II-141** est donc extrêmement élevé, de l'ordre de 2000, défini par le ratio entre l'IG₅₀ et l'IC₅₀. Cette valeur est supérieure à celle du Ko143 (300-400). Ainsi, bien que le Ko143 soit plus actif (IC₅₀ = 0,05-0,1 μM) que le **MBL-II-141**, il est également plus toxique (IG₅₀ = 18-34 μM).

Remarque : Nous serons amenés, au cours de ce travail, à parler d'EC₅₀ et d'IC₅₀. Lorsque l'inhibiteur étudié n'inhibe pas à 100 % l'efflux de la mitoxantrone, nous parlerons d'EC₅₀, valeur permettant d'obtenir 50% de l'inhibition maximale enregistrée pour le composé étudié. A l'inverse, pour une inhibition de 100% de l'efflux de la mitoxantrone, nous parlerons d'IC₅₀, valeur permettant d'obtenir 50% de l'inhibition complète. L'IG₅₀, quant à elle, représente la concentration conduisant à 50% d'inhibition maximale de prolifération cellulaire.

L'efficacité du **MBL-II-141** à inhiber l'efflux de la mitoxantrone *via* ABCG2 fut également confirmée par la capacité de ce composé à sensibiliser à nouveau la croissance cellulaire à la mitoxantrone (**Figure 32A**). L'entière chimiosensibilisation obtenue à 0,2 μM est en accord avec la valeur d'IC₅₀ déterminée. De plus, ces résultats suggèrent que le **MBL-II-141** n'est pas transformé durant les 72 h d'expérience. Des résultats similaires furent obtenus avec le SN-38, métabolite actif de l'irinotécan transporté par ABCG2 (**Figure 32B**).

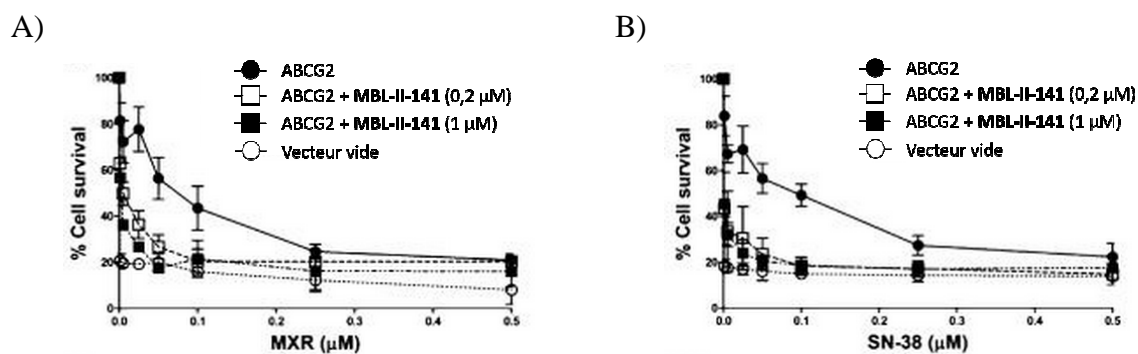


Figure 32 : Etude de l'impact du **MBL-II-141** sur la sensibilisation de la croissance cellulaire à la mitoxantrone (A) et au SN-38 (B). La viabilité cellulaire des cellules HEK293 surexprimant ABCG2 a été déterminée *via* un co-traitement pendant 72 h avec la mitoxantrone ou le SN-38 (0-0,5 μM) et le **MBL-II-141**. Les valeurs représentent la moyenne \pm la déviation standard et sont issues d'au moins trois expériences indépendantes réalisées en triplicata.²³⁹

Pour finir, l'effet du **MBL-II-141** sur l'hydrolyse de l'ATP a été étudié sur des membranes cellulaires d'insectes Sf9 surexprimant ABCG2. Tout comme le Ko143, le **MBL-II-141** est capable d'inhiber l'activité ATPasique couplée, activité stimulée par la présence de quercétine. Mais il a également été observé que ce composé est capable d'inhiber l'activité ATPasique basale, activité mesurée sans transport de substrat.

A l'issue de ces résultats *in vitro* prometteurs, le **MBL-II-141** s'est révélé être un excellent candidat pour des études *in vivo*²⁴⁰ et a été testé sur des souris SCID xénogreffées par des cellules humaines résistantes à ABCG2. La combinaison de 10 mg/kg de **MBL-II-141** avec l'irinotécan bloque complètement la croissance de 90% de tumeurs fraîchement implantées (**Figure 33**).

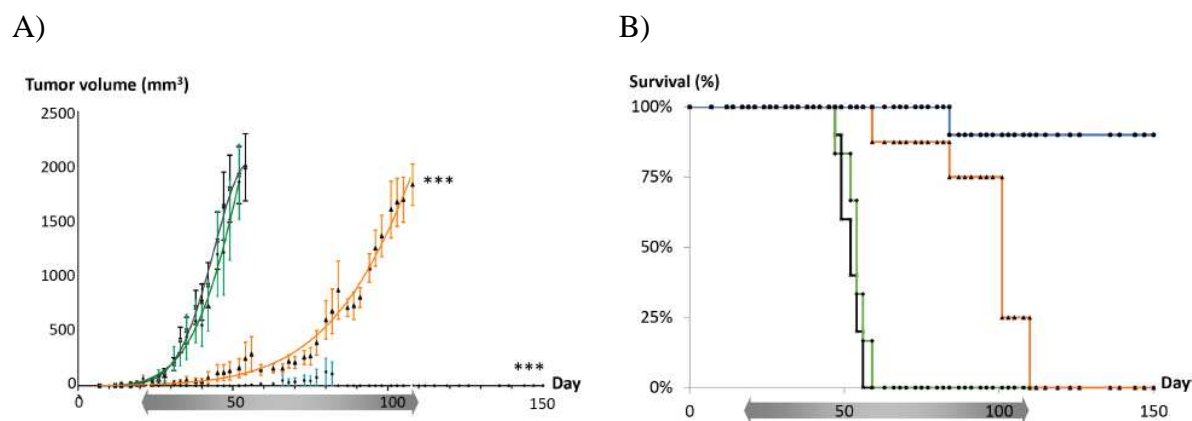


Figure 33 : Effet du **MBL-II-141** et de l'irinotécan sur la croissance tumorale et la survie des souris SCID xénogreffées par des cellules humaines surexprimant ABCG2 et présentant des tumeurs fraîchement implantées. Les souris ont été traitées avec un vecteur vide constitué d'huile de maïs + 0,5% DMSO (courbes noires), **MBL-II-141** à 10 mg/kg (courbes vertes), huile de maïs + 0,5% DMSO + irinotécan à 20 mg/kg (courbes orange) et **MBL-II-141** à 10 mg/kg + irinotécan à 20 mg/kg (courbes bleues). Le traitement commence au jour 21 et finit au jour 108.²⁴⁰

Sur des tumeurs ayant déjà atteint un diamètre de 8 mm, le traitement au **MBL-II-141** seul ne présente aucun effet significatif. Le traitement avec l'irinotécan seul retarde la croissance de la tumeur mais n'améliore pas la survie des souris. Seule la combinaison entre le **MBL-II-141** et l'irinotécan parvient à réduire considérablement la croissance de la tumeur, et ainsi à améliorer la survie des souris (**Figure 34**). De plus, le **MBL-II-141** est bien toléré et bien absorbé *via* une ingestion forcée (à une dose de 50 mg/kg).

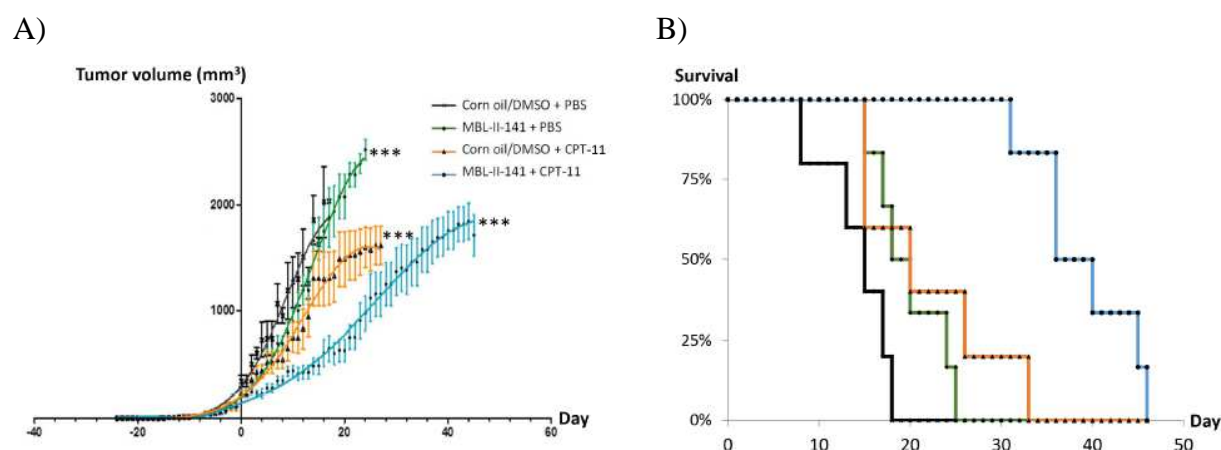


Figure 34 : Effets du **MBL-II-141** et de l'irinotécan sur la croissance tumorale (A) et la survie des souris SCID xénogreffées (B) par des cellules humaines surexprimant ABCG2 et présentant des tumeurs de 8 mm de diamètre. Les souris ont été traitées avec un vecteur vide constitué d'huile de maïs + 0,5% DMSO (courbes noires), **MBL-II-141** à 10 mg/kg (courbes vertes), huile de maïs + 0,5% DMSO + irinotécan à 20 mg/kg (courbes orange) et **MBL-II-141** à 10 mg/kg + irinotécan à 20 mg/kg (courbes bleues).²⁴⁰

Cette expérience démontre bien l'efficacité du **MBL-II-141** à potentialiser à nouveau l'effet d'un anticancéreux sur une lignée chimiorésistante en milieu biologique. L'ensemble de ces données pharmacologiques font du **MBL-II-141** le meilleur inhibiteur mis au point à ce jour et un bon candidat pour le développement clinique. Cependant, malgré ces résultats prometteurs, le **MBL-II-141** présente des problèmes d'hydrosolubilité. Il est ainsi nécessaire de poursuivre son étude afin de tenter d'améliorer ses propriétés physico-chimiques et pharmacocinétiques.

II. Travaux personnels : conception, synthèse et évaluation biologique de nouveaux inhibiteurs actifs, sélectifs et non toxiques d'ABCG2

II.1. OBJECTIFS DES TRAVAUX PERSONNELS

Comme nous l'avons vu précédemment, le **MBL-II-141** est le meilleur inhibiteur d'ABCG2 mis au point à ce jour. Il est ainsi intéressant de poursuivre et d'approfondir les études de relations structure-activité de cette structure afin d'optimiser son activité biologique ainsi que ses propriétés physico-chimiques et pharmacocinétiques. De plus, aucune structure cristallographique d'ABCG2 n'étant encore disponible, empêchant ainsi toute étude *in silico*, les informations apportées par l'étude approfondie du comportement des analogues du **MBL-II-141** vis-à-vis de la protéine permettront d'enrichir l'étude fondamentale de la protéine et de proposer de nouvelles hypothèses quant aux mécanismes d'inhibition mis en jeu.

II.2. CHOIX DES MOLÉCULES À SYNTHÉTISER

Une première étude de relations structure-activité, réalisée antérieurement au laboratoire²³⁸ et conduisant à la découverte du **MBL-II-141**, a d'ores et déjà permis d'identifier trois éléments structuraux nécessaires à une inhibition maximale :

- la présence d'un **motif chromone**, présentant une inhibition 2 à 3 fois plus efficace que les motifs flavones, acridones, boeravinones ou d'autres types de flavonoïdes ;
- un groupement ***para*-bromobenzyloxy** porté par la chromone. En effet, la taille et l'hydrophobicité de ce groupement semblent constituer des critères importants pour l'inhibition d'ABCG2 et en particulier pour la cytotoxicité. Un groupement hydrophobe et de taille raisonnable semble convenir pour la substitution présente sur le groupement benzyloxy ;

- la présence d'un **motif tryptamine**, montrant des résultats bien plus efficaces que des groupements tels que la phénylpipérazine, la pyridylpipérazine, la benzylpipérazine ou le diméthoxyphényle.

Nous avons poursuivi ce travail dans le cadre de cette thèse et avons choisi le **MBL-II-141** comme composé chef de file à partir duquel différentes pharmacomodulations ont été réalisées (**Figure 35**).

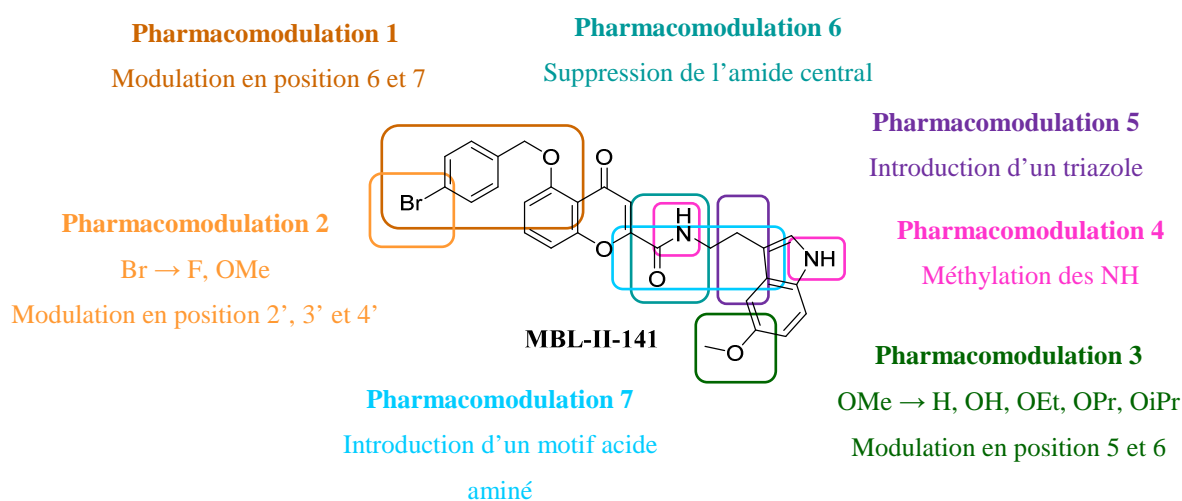


Figure 35 : Pharmacomodulations réalisées à partir de la structure du **MBL-II-141**.

Ces pharmacomodulations modulent différentes parties de la structure du **MBL-II-141**.

Dans un premier temps, un premier jeu de pharmacomodulations a été entrepris sur la partie chromone du **MBL-II-141**. En effet, l'influence de la position du groupement *para*-bromobenzoyloxy sur le profil pharmacologique a été étudiée en position 6 et en position 7 de la chromone (**pharmacomodulation 1**). De plus, comme nous l'avons dit précédemment, la présence d'un groupement hydrophobe tel qu'un atome de brome en position *para* du groupement benzoyloxy semble être importante pour l'inhibition et la cytotoxicité. Nous avons ainsi modulé la nature de l'halogène en le remplaçant par un atome de fluor et un groupement méthoxy et étudié sa position sur le groupement benzoyloxy (**pharmacomodulation 2**).

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à la partie indolique du **MBL-II-141**. Des études précédentes de relations structure-activité démontrant l'importance de la présence du groupement méthoxy sur la partie aromatique reliée à l'amide pour une bonne activité

CHAPITRE 2. MODULATION DE LA PROTÉINE ABCG2

inhibitrice d'ABCG2, nous avons décidé de moduler sa nature et sa position sur l'indole afin d'en étudier l'impact sur le profil pharmacologique. Le groupement méthoxy fut remplacé par un hydrogène, puis des groupements hydroxy, éthyloxy, propyloxy et isopropyloxy. Le groupement méthoxy fut également déplacé en position 6 de l'indole (**pharmacomodulation 3**). De plus, nous avons jugé opportun d'étudier l'influence du caractère donneur/accepteur des liaisons N-H en méthylant les azotes indolique et amidique de notre chef de file (**pharmacomodulation 4**).

Pour finir, la chaîne centrale du **MBL-II-141** a également été l'objet de certaines modulations telles que l'introduction de cycles triazoliques différemment substitués, souvent utilisés en chimie médicinale (**pharmacomodulation 5**). L'amide central a également été remplacé par une fonction amine tertiaire afin d'étudier son influence sur l'inhibition d'ABCG2 (**pharmacomodulation 6**). Puis un dernier jeu de pharmacomodulations a consisté en l'introduction de différents motifs acides aminés, tels que la valine, la leucine et l'isoleucine, dans la partie centrale de nos composés (**pharmacomodulation 7**).

II.3. SYNTHÈSE DES ANALOGUES DU MBL-II-141

II.3.1. Re-synthèse du MBL-II-141

La synthèse du **MBL-II-141**, mise au point et utilisée depuis plusieurs années au laboratoire,²³⁸ se divise en 4 étapes à partir de la 2,6-dihydroxyacétophénone commerciale. Elle présente un rendement global de 19% (**Schéma réactionnel 1**).

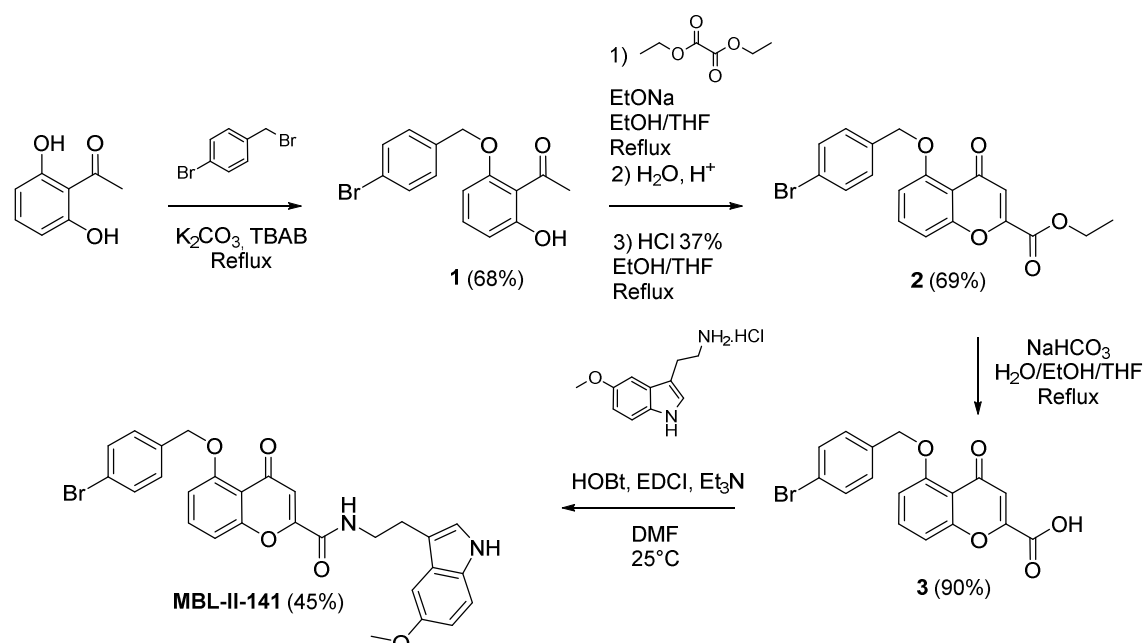


Schéma réactionnel 1 : Synthèse du **MBL-II-141**.

La 2,6-dihydroxyacétophénone subit dans un premier temps une mono-alkylation par action du carbonate de potassium en présence de 1,2 équivalents du bromure de *para*-bromobenzyle dans l'acétone.²⁴¹ Cette étape nécessite l'ajout de bromure de tétrabutylammonium jouant le rôle de catalyseur de transfert de phase. La chélation d'une fonction phénol avec l'oxygène de la fonction carbonyle permet d'expliquer la formation du produit mono-alkylé seul. Ce dérivé alkylé **1** est ensuite condensé avec l'oxalate de diéthyle en présence d'éthanolate de sodium, généré *in situ* par action du sodium dans l'éthanol anhydre, puis déshydraté en milieu acide afin de former l'ester **2**, hétérocycle de la famille des chromones, avec un rendement de 69%.^{242, 243} Le groupement éthoxycarbonyl porté en position 2 de la chromone est ensuite saponifié par action d'hydrogénocarbonate de sodium à reflux afin de fournir l'acide carboxylique **3** avec un rendement de 90%. Pour finir l'acide **3** est engagé dans une réaction de couplage peptidique avec le chlorhydrate de la 5-méthoxytryptamine en présence d'hydroxybenzotriazole (HOBt), de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDCI) et de triéthylamine dans le DMF afin d'obtenir le **MBL-II-141** avec un rendement de 45%.²⁴⁴

Nous avons tenté d'améliorer ce dernier rendement par plusieurs essais d'amidification avec différents agents de couplages (**Tableau 4**). Cependant, nous ne sommes pas parvenus à l'optimiser de manière significative. Nous avons donc choisi de conserver ces conditions classiques d'amidification (HOBt, EDCI et triéthylamine dans le DMF) lors des réactions de couplage réalisées entre les dérivés de l'acide **3** et les dérivés de la tryptamine. L'utilisation

CHAPITRE 2. MODULATION DE LA PROTÉINE ABCG2

d'HOBt hydraté n'a pas d'influence sur la valeur du rendement d'amidification. Néanmoins, nous verrons plus tard que d'autres conditions sont excellentes pour le couplage entre l'acide **3** et certaines amines, non dérivées de tryptamine.

Agents de couplages	Base	Solvant	Rendement
Chlorure de Bis (2-oxo-3-oxazolidinyl)phosphonique (BOP-Cl)	Et ₃ N	DMF	30%
Tétrafluoroborate de <i>N,N,N',N'</i> -Tétraméthyl- <i>O</i> -(benzotriazol-1-yl)uronium (TBTU)	DIEA	DMF	24%
EDCI, isonitrosocynoacétate d'éthyle ^a	Et ₃ N	DMF	50%

Tableau 4 : Essais de couplage peptidique entre l'acide **3** et le chlorhydrate de la 5-méthoxytryptamine. ^a Ce réactif remplace HOBt anhydre qui n'est plus disponible à l'heure actuelle chez les fournisseurs classiques.

La transformation de l'acétophénone **1** en chromone **2** passe par la formation d'un intermédiaire **2'** (**Figure 36**).

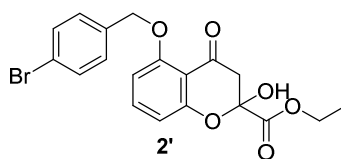


Figure 36 : Structure de l'intermédiaire **2'**.

Cet intermédiaire a été isolé et caractérisé par RMN et LC-MS basse résolution. En RMN ¹H, un signal à 2,76 ppm sous la forme d'un doublet et un signal à 3,22 ppm sous la forme d'un doublet de doublet présentent des constantes de couplage ²*J* de 15,8 Hz, caractéristiques d'un couplage géminé. Ils attestent ainsi de la présence de deux hydrogènes portés par le carbone situé entre le carbonyle et le carbone asymétrique (**Figure 37**). La multiplicité inattendue du signal à 3,22 ppm sous la forme d'un doublet de doublet peut être expliquée par le couplage en ³*J* (1,9 Hz) de l'un des deux hydrogènes étudiés avec l'hydrogène de la fonction alcool.

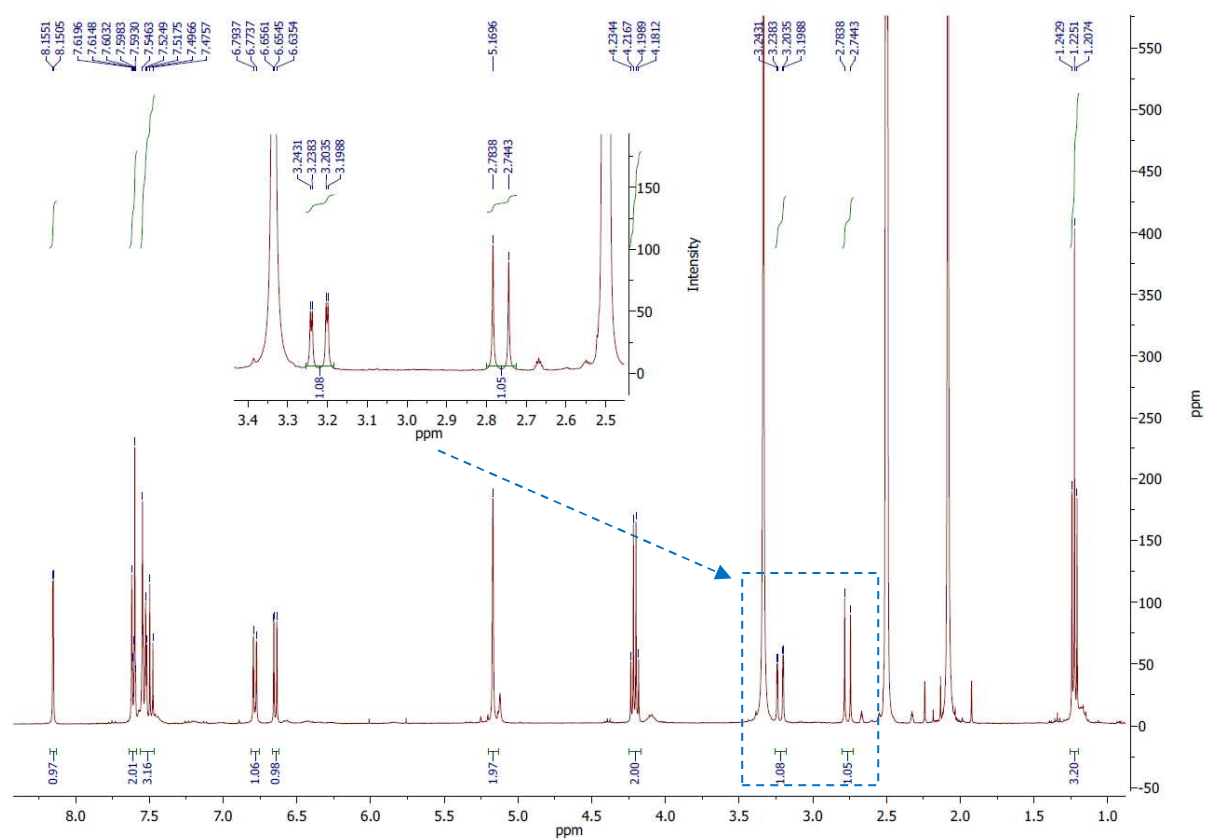
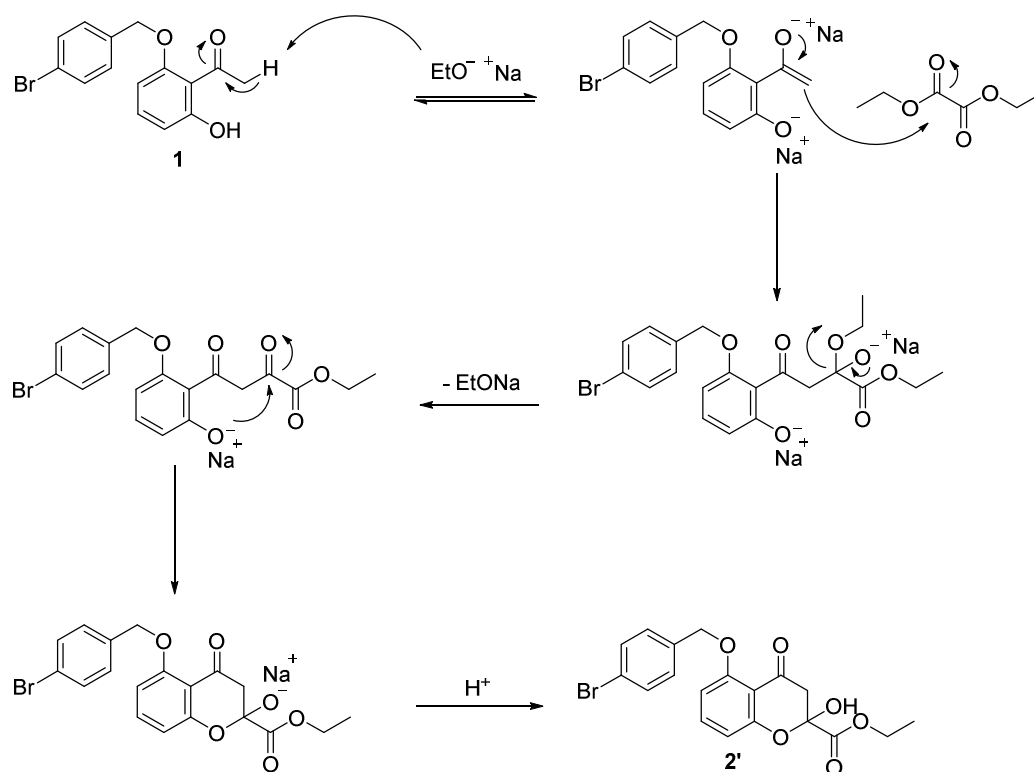


Figure 37 : Spectre RMN ^1H de l'intermédiaire **2'** dans le DMSO-d_6 .

L'intermédiaire **2'** est issu de la réaction de condensation du composé **1** avec l'oxalate de diéthyle en milieu basique. Le mécanisme réactionnel correspondant à la formation de l'intermédiaire **2'** est décrit dans le **Schéma réactionnel 2**.

- *Condensation avec l'oxalate de diéthyle en milieu basique et formation de 2'*



- *Déshydratation de 2' et formation de 2*

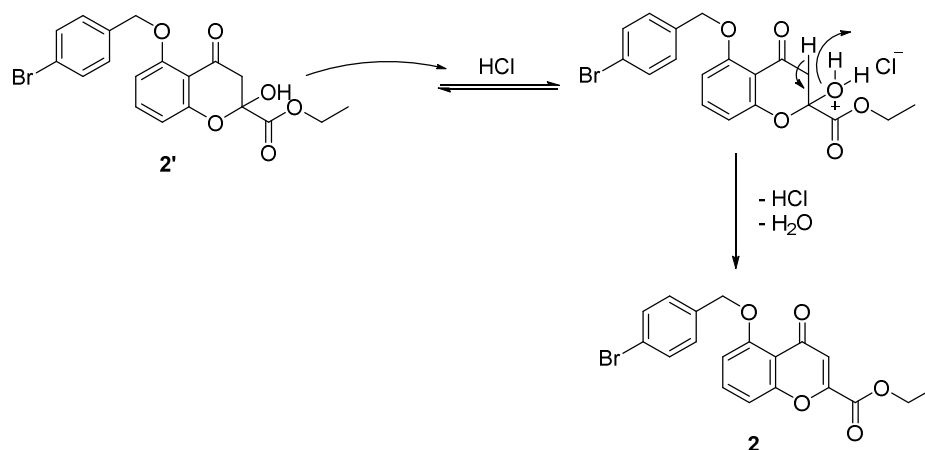


Schéma réactionnel 2 : Mécanisme réactionnel correspondant à la formation de l'intermédiaire **2'** puis à sa transformation en chromone **2**.

Une voie synthétique identique à celle du **MBL-II-141** fut ensuite employée pour former un grand nombre d'analogues décrits au cours de ce travail (**Schéma réactionnel 3**).

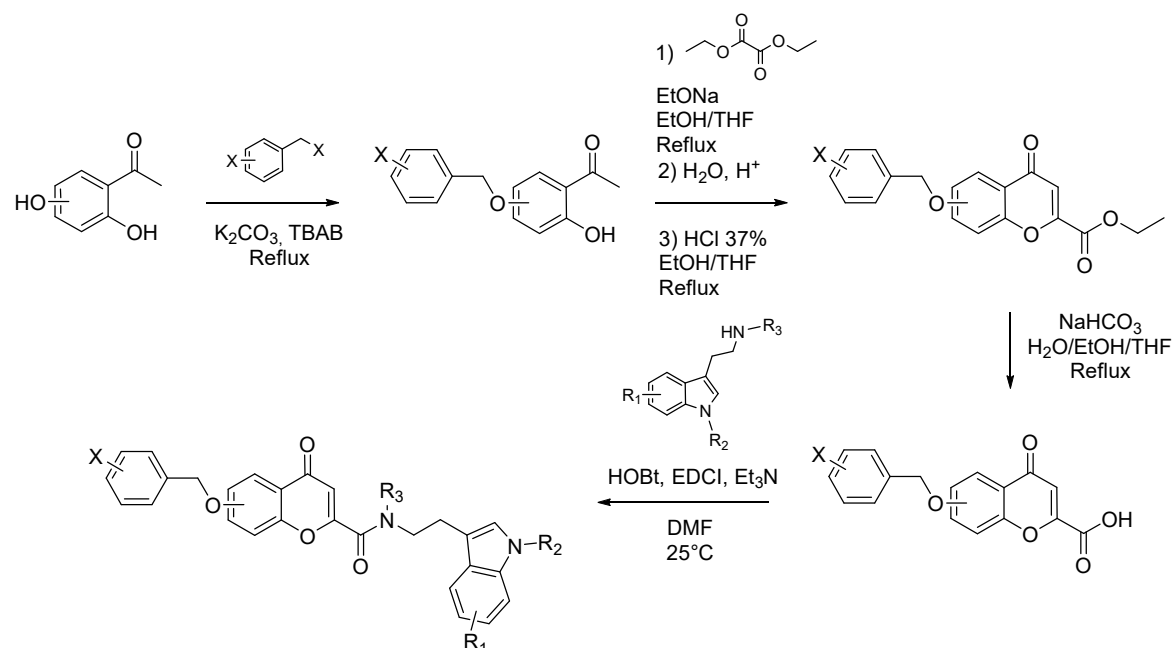


Schéma réactionnel 3 : Schéma général de synthèse de certains analogues du **MBL-II-141**.

II.3.2. Synthèse des analogues issus de la pharmacomodulation 1

La position du groupement *para*-bromobenzyloxy porté initialement en position 5 de la chromone fut étudiée en position 6 et en position 7 (**Figure 38**).

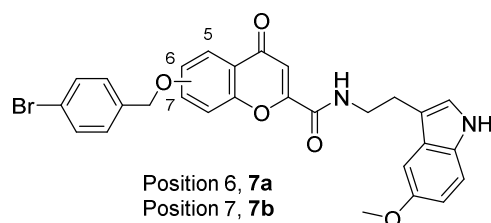


Figure 38 : Structures des composés **7a** et **7b**.

La synthèse de ces composés est identique à celle du **MBL-II-141** (**Schéma réactionnel 3**). Elle s'effectue à partir de la 2,5-dihydroxyacétophénone pour le composé **7a** et de la 2,4-dihydroxyacétophénone pour le composé **7b**. La première étape d'alkylation est réalisée dans les conditions classiques et fournit les dérivés mono-alkylés **4a** et **4b** avec des rendements de 40% et 87%. Ces dérivés mono-alkylés sont ensuite soumis à la réaction de cyclisation décrite précédemment pour le **MBL-II-141** pour conduire aux hétérocycles souhaités **5a** et **5b** avec des rendements de 30% et 80%. L'hydrolyse de l'ester est réalisée dans les conditions classiques et permet l'obtention des acides carboxyliques **6a** et **6b** avec des rendements de

47% et 70%. Pour finir, ces acides sont soumis à une réaction de couplage peptidique en présence du chlorhydrate de la 5-méthoxytryptamine à température ambiante dans le DMF pour conduire à la formation des composés finaux **7a** et **7b** avec des rendements de 41% et 45%. Les composés **7a** et **7b** ont finalement été obtenus avec des rendements globaux respectivement de 2,3% et 23% sur les 4 étapes.

II.3.3. Synthèse des analogues issus de la pharmacomodulation 2

II.3.3.1 Synthèse des analogues 11a à 11f

Dans le cadre de cette étude, deux groupements halogénés, le brome et le fluor, ont été étudiés en différentes positions sur le cycle benzyloxy porté par la chromone (**Figure 39**).

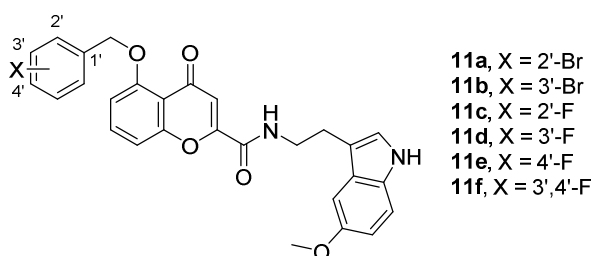


Figure 39 : Structures des composés **11a** à **11f**.

Ces composés sont synthétisés de la même manière que le **MBL-II-141**, à partir des bromures de benzyle ou chlorures de benzyle commerciaux correspondants. L'étape d'alkylation a ainsi été réalisée dans les conditions classiques et a permis d'obtenir les dérivés mono-alkylés **8a** à **8f** souhaités avec des rendements compris entre 27% et 73%. Puis l'étape de cyclisation a permis d'obtenir les dérivés **9a** à **9f** correspondant avec des rendements compris entre 18% et 87%. La saponification réalisée dans les mêmes conditions que le **MBL-II-141** a conduit à la synthèse des acides carboxyliques désirés **10a** à **10f** avec des rendements de 47% à 79%. Pour finir, l'étape de couplage peptidique a été conduite en suivant les conditions classiques. Différents essais de purification ont été entrepris pour les composés finaux. Certains ont été lavés avec de l'éther diéthylique, d'autres purifiés sur colonne ou encore recristallisés. En effet, les analogues **11c** et **11f** ont été recristallisés dans l'acétonitrile conduisant à de très faibles rendements (respectivement 7% et 5%). Ainsi les rendements globaux des composés **11a** à **11f** sont compris entre 0,2% et 17% sur les 4 étapes de synthèse.

Remarque : lors de l'étape de couplage peptidique conduisant à la synthèse du composé **11e**, nous avons utilisé, à la place de l'*HOBt*, l'isonitrosocyanoacétate d'éthyle, également appelé *Oxyrna Pure*.

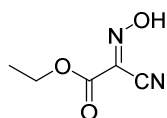


Figure 40 : Structure de l'isonitrosocyanoacétate d'éthyle.

II.3.3.2 Synthèse du dérivé **16**

Un groupement méthoxy a également été introduit en position 4' du cycle benzyloxy (**Figure 41**).

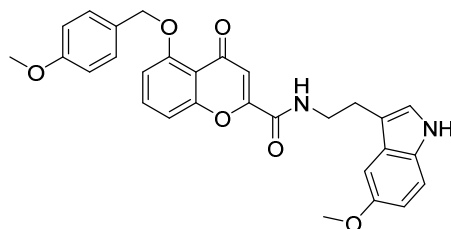


Figure 41 : Structure du composé **16**.

Dans un premier temps, une synthèse identique à celle du **MBL-II-141** a été entreprise à partir du chlorure de 4-méthoxybenzyle (**Schéma réactionnel 4**). La première étape d'alkylation de la 2,6-dihydroxyacétophénone par le chlorure de 4-méthoxybenzyle a permis d'obtenir le dérivé mono-alkylé **12** avec un rendement de 36%. Cependant, nous ne sommes pas parvenus à faire aboutir l'étape de cyclisation de la chromone dans les conditions classiques. Un autre essai de cyclisation utilisant l'hydrure de sodium dans le THF anhydre s'est également soldé par un échec.

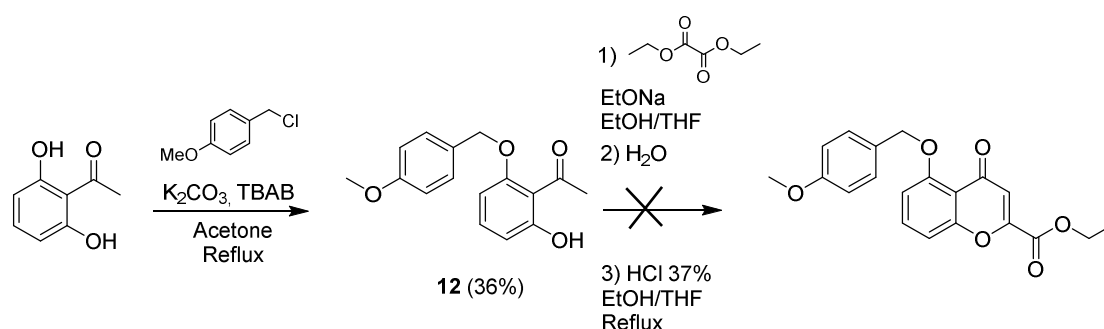


Schéma réactionnel 4 : Synthèse du dérivé **16** via la voie de synthèse du **MBL-II-141**.

Ainsi, une autre voie de synthèse a été mise en place (**Schéma réactionnel 5**).

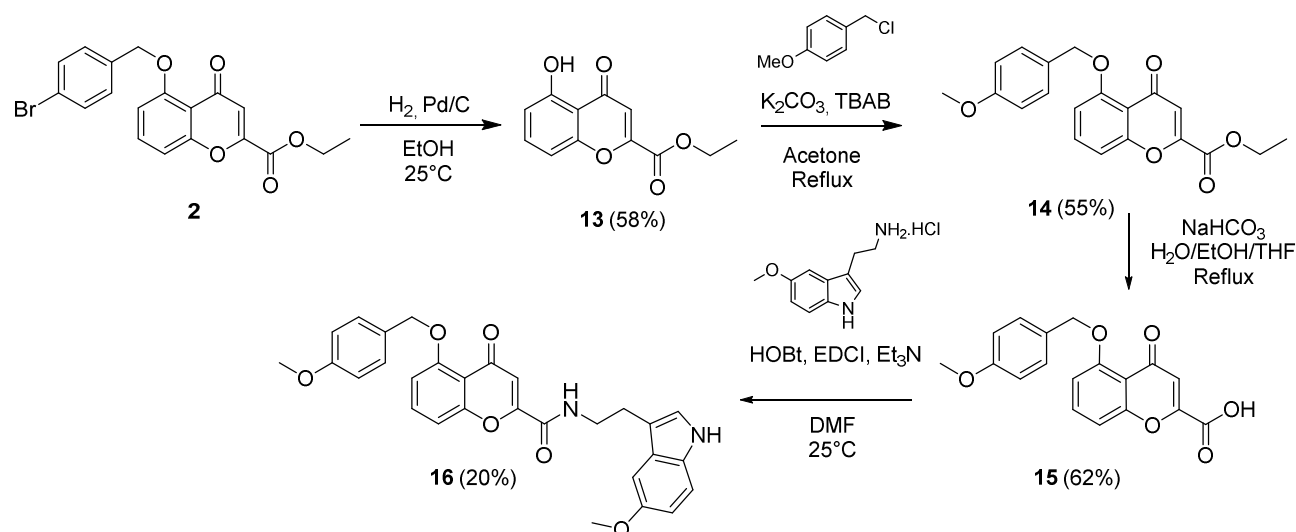


Schéma réactionnel 5 : Nouvelle voie de synthèse du dérivé **16**.

Une déprotection du groupement benzyloxy par action du dihydrogène en présence de charbon palladié activé sur l'ester **2** a permis l'obtention du phénol libre **13** avec un rendement de 58%. Ce phénol a ensuite été lui-même alkylé par action du chlorure de 4-méthoxybenzyle avec un rendement de 55%. Le composé **14** issu de cette étape a été saponifié avec un rendement de 62% puis couplé avec le chlorhydrate de la 5-méthoxytryptamine afin d'obtenir le dérivé final **16** avec un rendement de 20%. Le rendement global correspondant au composé final est ainsi de 4% sur 6 étapes.

II.3.4. Synthèse des analogues issus de la pharmacomodulation **3**

Dans le cadre de cette étude, nous avons fait varier la nature du groupement R_1 porté en position 5 de l'indole ainsi que sa position lorsque celui-ci est un groupement méthoxy (**Figure 42**).

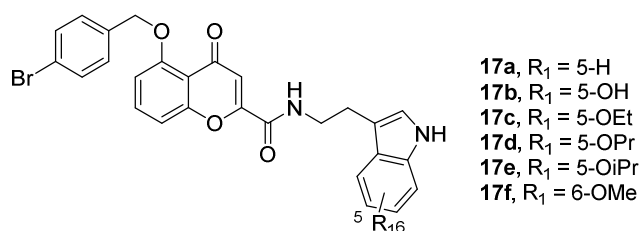


Figure 42 : Structures des composés **17a** à **17f**.

Les analogues **17a** et **17b** portant respectivement un atome d'hydrogène et un groupement hydroxy en position 5 du cycle indolique ont été synthétisés à partir de l'acide **3** engagé dans une réaction de couplage peptidique respectivement avec les chlorhydrates de la tryptamine et de la sérotonine dans les conditions classiques de couplage peptidique avec des rendements de couplage respectivement de 31% et 56%. Ainsi ces composés ont été isolés avec des rendements globaux respectifs de 13% et 24% sur 4 étapes.

Les dérivés **17c**, **17d** et **17e** ont été synthétisés *via* une réaction d'alkylation du dérivé **17b** par action du carbonate de potassium en présence d'iodoéthane, de 1-iodopropane et de 2-iodopropane avec des rendements compris entre 17% et 31% (**Schéma réactionnel 6**).

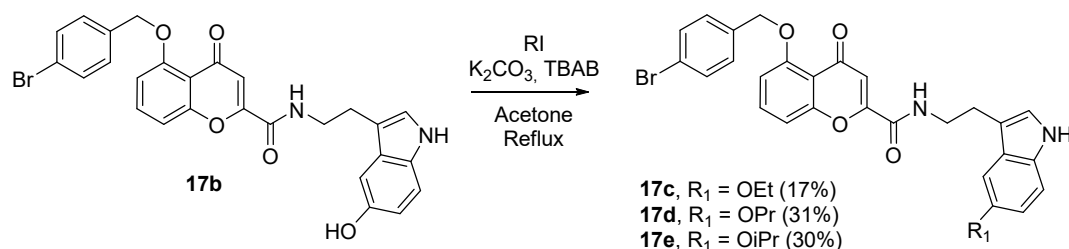


Schéma réactionnel 6 : Synthèse des dérivés **17c**, **17d** et **17e**.

Le composé **17f** possédant un groupement méthoxy en position 6 de l'indole est issu du couplage peptidique entre l'acide **3** et le chlorhydrate de la 6-méthoxytryptamine commercial réalisé dans les conditions identiques au **MBL-II-141** et a été obtenu avec un rendement de global de 5%.

II.3.5. Synthèse des analogues issus de la pharmacomodulation 4

II.3.5.1 Synthèse des analogues 25a à 25e

Les composés **25a** à **25e** sont issus d'un couplage peptidique entre l'acide **3** et différents dérivés de la tryptamine synthétisés au laboratoire. Les mêmes conditions de couplage que celles employées pour la synthèse du **MBL-II-141** ont été utilisées (**Schéma rétrosynthétique 1**).²⁴⁴

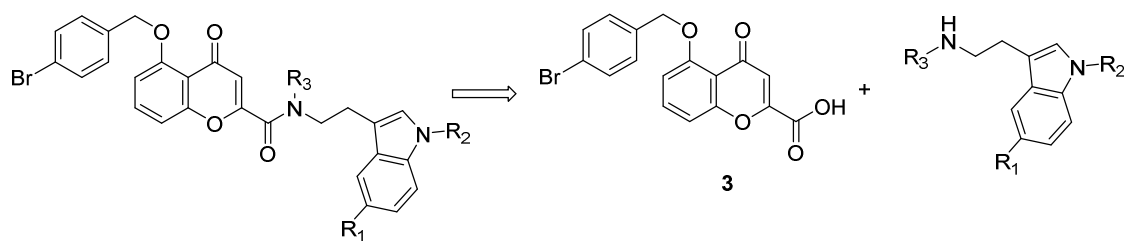


Schéma rétrosynthétique 1 de la méthylation de l'azote amidique et de l'azote indolique.

II.3.5.2 Synthèse des dérivés de la tryptamine

Afin de synthétiser les dérivés de la tryptamine et de la 5-méthoxytryptamine mono-méthylés sur l'amine primaire (composés **19a** et **19b**), il est nécessaire, lors d'une première étape, d'introduire un groupement éthoxycarbonyl par action du chloroformiate d'éthyle en présence de triéthylamine dans le dichlorométhane à température ambiante.²⁴⁵ Puis les carbamates **18a** et **18b** sont réduits par action de l'hydruire mixte d'aluminium et de lithium dans le THF à reflux afin d'obtenir les composés mono-méthylés **19a** et **19b** avec des rendements respectifs de 72% et 80% (Schéma réactionnel 7).²⁴⁶

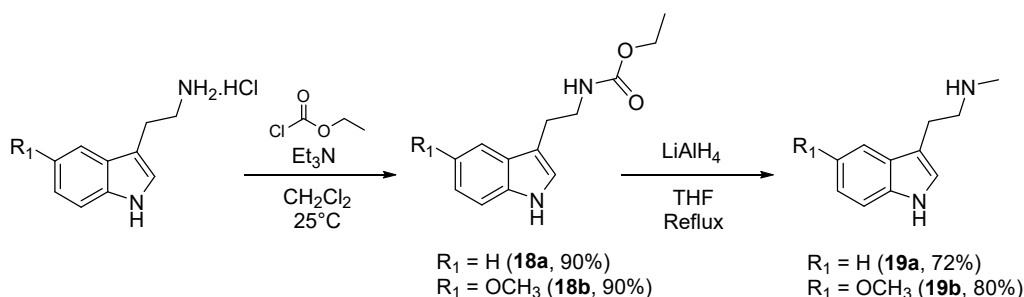


Schéma réactionnel 7 : Synthèse des composés **19a** et **19b**.

Afin d'obtenir les dérivés de la tryptamine et de la 5-méthoxytryptamine mono-méthylés sur l'azote indolique (composés **22a** et **22b**), il est nécessaire dans un premier temps de protéger l'amine primaire (étape 1). Pour cela, différents groupements protecteurs (GP) peuvent être utilisés tels que le groupement *tert*-butoxycarbonyl (BOC)²⁴⁷ ou le groupement acétyle. Une seconde étape consiste à méthyler l'azote indolique en milieu basique (étape 2). Différents agents méthylant peuvent être employés, tels que l'iodométhane ou le diméthyle sulfate. Pour finir, la déprotection permet d'obtenir les amines primaires souhaitées (étape 3) (Schéma réactionnel 8).

CHAPITRE 2. MODULATION DE LA PROTÉINE ABCG2

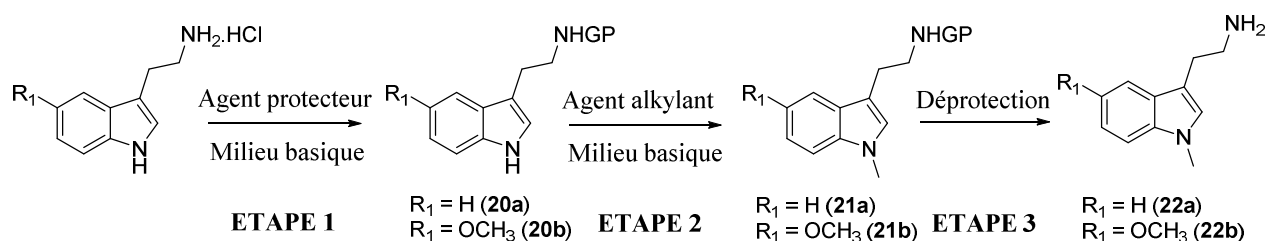


Schéma réactionnel 8 : Méthylation de l'azote indolique (GP = Groupement Protecteur).

Le **Tableau 5** décrit l'ensemble des conditions utilisées ainsi que les rendements obtenus pour la synthèse des analogues **22a** et **22b**.

ÉTAPE 1 - Protection				ÉTAPE 2 - Méthylation			ÉTAPE 3 - Déprotection	
R_1	GP	Conditions	Rendement	Agent méthylant	Conditions	Rendement	Conditions	Rendement
H	BOC	Et ₃ N	99% (20a)	Me ₂ SO ₄	NaOH/TBAB	41% (21a)	TFA	23% (22a)
		CH ₂ Cl ₂ 25°C			CH ₂ Cl ₂ 25°C		CH ₂ Cl ₂ 25°C	
OCH ₃	Acetyl	K ₂ CO ₃	59% (20b)	CH ₃ I	NaOH/TBAB	62% (21b)	NaOH	56% (22b)
		EtOAc/H ₂ O 25°C			CH ₂ Cl ₂ 25°C		EtOH/H ₂ O Reflux	

Tableau 5 : Conditions utilisées pour la synthèse des dérivés *N*-méthylés de la tryptamine **22a** et de la 5-méthoxytryptamine **22b**. GP = Groupement Protecteur.

Ainsi le composé **22a** a été obtenu à partir de la tryptamine sous forme de base libre, protégée par un groupement BOC par action de l'anhydride de BOC en présence de triéthylamine dans le dichlorométhane afin d'obtenir le composé **20a**. Ce dérivé a ensuite été méthylé par action du diméthylsulfate dans le dichlorométhane en présence d'hydroxyde de sodium et d'un ammonium quaternaire afin de conduire au composé **21a** avec un rendement de 41%. Ce dernier est ensuite déprotégé dans les conditions classiques par action de l'acide trifluoroacétique afin d'obtenir l'amine primaire **22a** avec un rendement de 23%.²⁴⁸

Le composé **22b** a quant à lui été obtenu à partir du chlorhydrate de la 5-méthoxytryptamine, *N*-acétylé selon une variante de la réaction de Schotten-Baumann : l'amine basique du dérivé tryptamine, libérée *in situ* par action du carbonate de potassium dans un milieu biphasique (eau/acétate d'éthyle) est amidifiée par le chlorure d'acétyle à 0°C pour conduire à la

formation du composé **20b** avec un rendement de 59%. Ce composé a ensuite été méthylé en présence d'iodométhane et d'hydroxyde de sodium dans les conditions décrites précédemment pour former le composé **21b** avec un rendement de 62%. La déprotection est ensuite réalisée en milieu basique par action d'hydroxyde de sodium à reflux dans un mélange éthanol/eau afin de former le composé **22b** avec un rendement de 56%.

Le dérivé de la tryptamine diméthylé sur les azotes amidique et indolique (**24**) a été synthétisé à partir du carbamate **18a** selon la voie présentée sur le **Schéma réactionnel 9**.

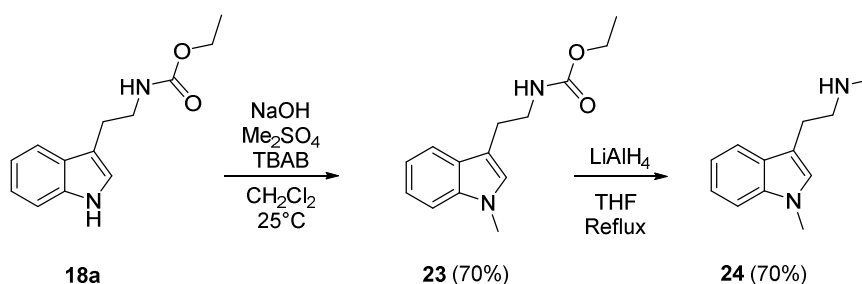


Schéma réactionnel 9 : Synthèse du dérivé diméthylé de la tryptamine **24**.

La première étape est la méthylation du dérivé **18a** par action du diméthylsulfate en présence d'hydroxyde de sodium et d'un ammonium quaternaire afin de former le composé **23**, méthylé en position 1, avec un rendement de 70%. Le composé **23** a ensuite été réduit avec l'hydrure mixte d'aluminium et de lithium pour conduire au composé **24** avec un rendement de 70%.

II.3.5.3 *Obtention des analogues par couplage peptidique*

Une fois les dérivés de la tryptamine synthétisés, l'étape finale est le couplage peptidique entre l'acide **3** et les dérivés de la tryptamine dans les conditions classiques afin d'obtenir les produits finaux **25a** à **25e** (**Figure 43**). Les rendements de l'étape de couplage sont compris entre 19% et 37%.

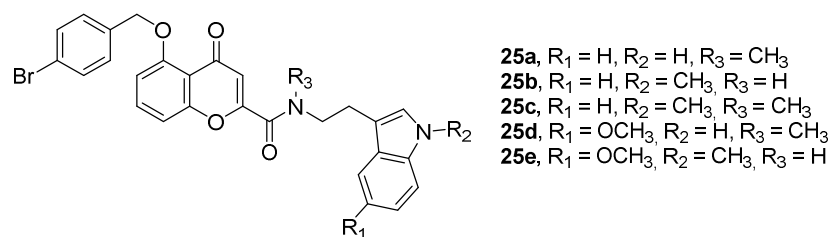


Figure 43 : Structures des composés **25a** à **25e**.

II.3.5.4 Synthèse de l'analogue **25f**

L'analogue **25f** diméthylé sur les azotes amidiques et indoliques et présentant un groupement méthoxy en position 5 du cycle indolique a été synthétisé à partir d'une diméthylation directe du **MBL-II-141** par action d'iodométhane en présence d'hydrure de sodium à température ambiante dans le THF avec un rendement de 25% (**Schéma réactionnel 10**).

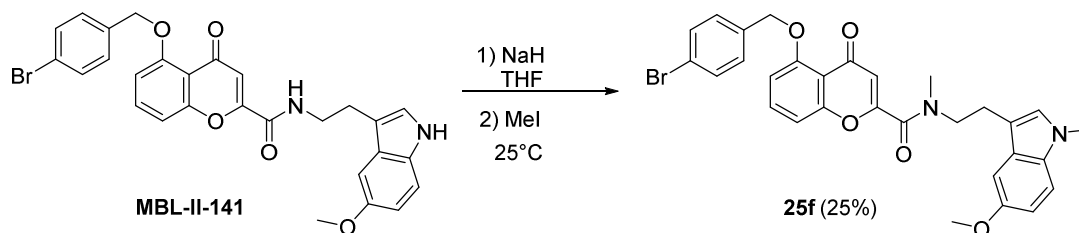


Schéma réactionnel 10 : Synthèse du dérivé **25f** à partir du **MBL-II-141**.

II.3.5.5 Synthèse des analogues **25g** et **25h**

Les composés **25g** et **25h** sont obtenus par couplage peptidique dans les conditions classiques à partir de l'acide **6a** et respectivement des dérivés de la tryptamine **19a** et **24** avec des rendements de 42% et 37% (**Figure 44**).

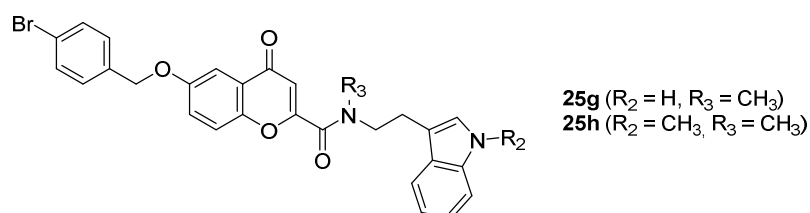


Figure 44 : Structures des composés **25g** et **25h**.

II.3.6. Synthèse des analogues issus de la pharmacomodulation 5

La synthèse de ces dérivés est représentée sur le **Schéma réactionnel 11**.

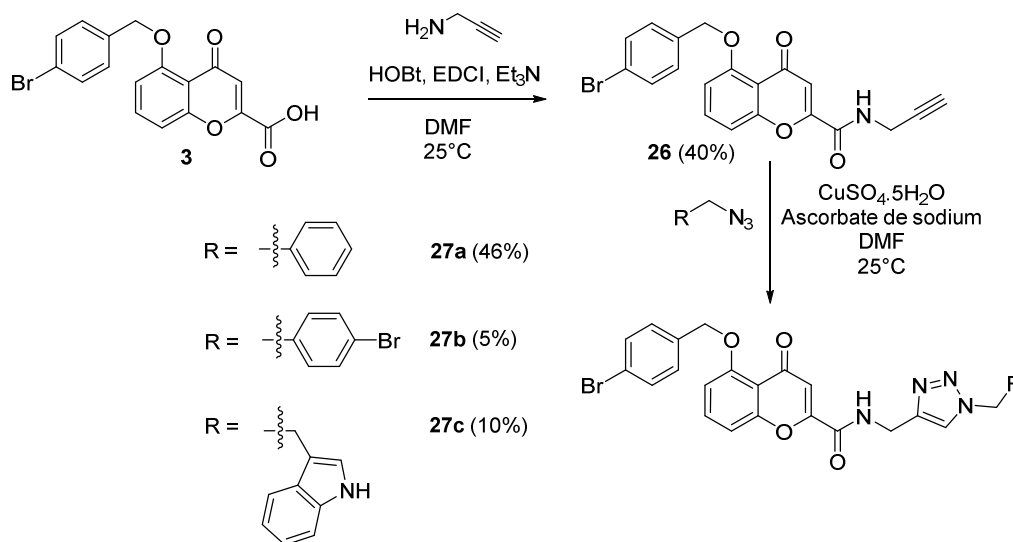


Schéma réactionnel 11 : Synthèse des dérivés **27a**, **27b** et **27c**.

Elle débute par une réaction de couplage peptidique entre l'acide **3** et la propargylamine dans les conditions classiques de couplage peptidique afin d'obtenir le composé **26** avec un rendement de 40% (**Schéma réactionnel 11**). Cette étape permet d'introduire une triple liaison nécessaire à la synthèse du triazole réalisée par chimie click. En effet, la cycloaddition de Huisgen, cycloaddition 1,3-dipolaire entre un azoture et un alcyne, permet la formation du cycle triazolique. De plus, une catalyse par le cuivre (I) conduit exclusivement au régioisomère 1,4.^{249, 250} Cette réaction se nomme CuAAC pour la cycloaddition 1,3-dipolaire azoture-alcyne catalysée par le cuivre (I). Le mécanisme proposé par Sharpless est décrit sur la **Figure 45**.²⁵⁰

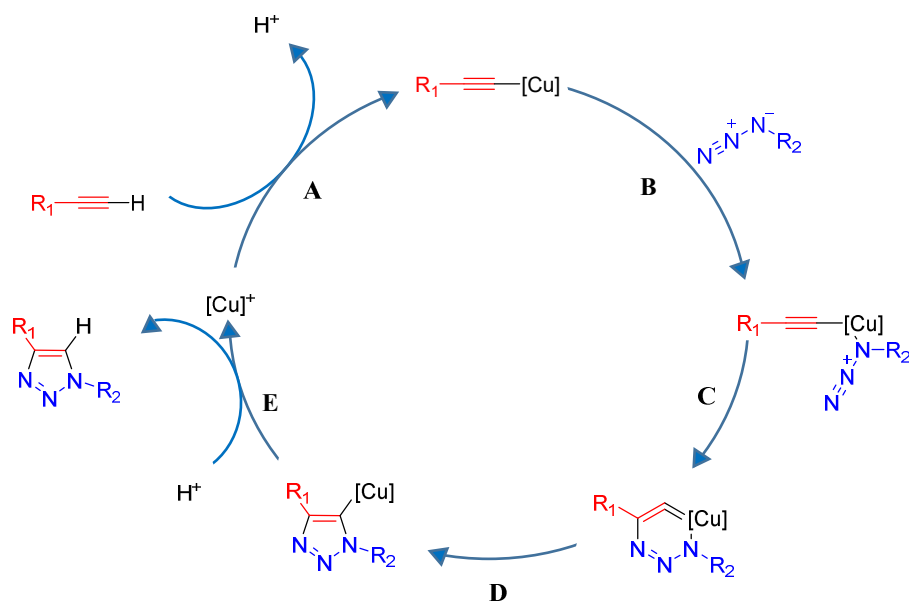


Figure 45 : Cycle catalytique selon Sharpless de la cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée par du cuivre (I) (CuAAC).²⁵⁰

Ainsi cette réaction a été réalisée dans les conditions classiques de CuAAC par réduction *in situ* des sels de cuivre (II), apportés sous la forme de sulfate de cuivre pentahydrate ($CuSO_4 \cdot H_2O$) par l'ascorbate de sodium jouant le rôle de l'agent réducteur. Le solvant choisi a été le DMF et les composés **27a** à **27c** ont été obtenus avec des rendements de 5 à 46% (**Schéma réactionnel 11**).

Les azotures engagés dans la synthèse des composés **27a** et **27b**, respectivement l'azoture de benzyle et l'azoture de 4-bromobenzyle, sont commerciaux. L'azoture utilisé pour l'obtention du composé **27c** a quant à lui été synthétisé au laboratoire par substitution nucléophile entre l'azoture et le brome du 3-(2-bromoéthyl)indole dans le DMF. Ce dernier est obtenu avec un rendement de 50% (**Schéma réactionnel 12**).

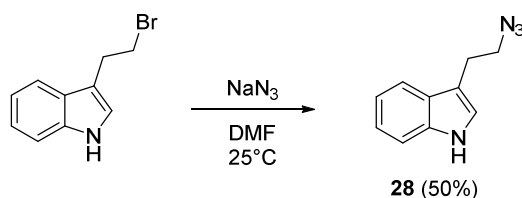


Schéma réactionnel 12 : Synthèse de l'azoture **28**.

II.3.7. Synthèse des analogues issus de la pharmacomodulation 6

Dans le cadre de cette pharmacomodulation, deux analogues, l'un sous forme chlorhydrate (composé **32a**), et l'autre sous forme de base libre méthoxylé en position 5 du cycle indolique (composé **31b**) ont été synthétisés (**Figure 46**).

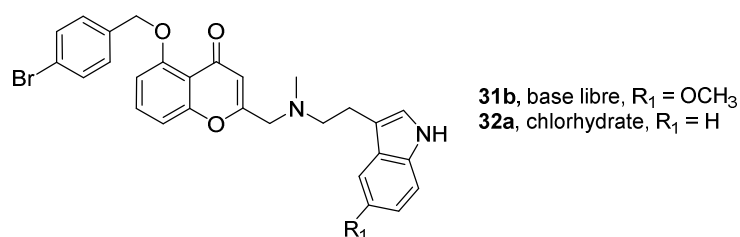


Figure 46 : Structures des composés **31b** et **32a**.

Les composés **31b** et **32a** ont été obtenus à partir de l'ester **2** réduit par action du borohydrure de sodium dans le méthanol. L'alcool **29** obtenu a ensuite été activé sous la forme du tosylate **30** avec un rendement global de 12%. Puis le composé **30** a été couplé avec un dérivé *N*-méthylé de la tryptamine afin de former **31b** et **32a** (**Schéma réactionnel 13**).

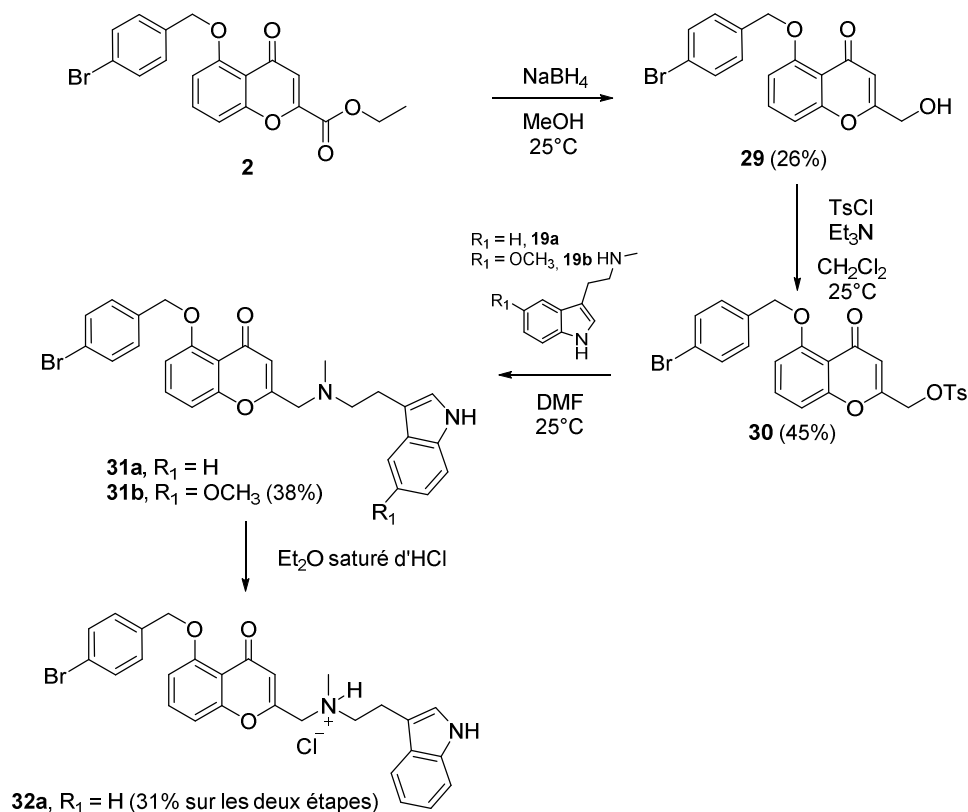


Schéma réactionnel 13 : Synthèse des dérivés **31b** et **32a**.

Le chlorhydrate **32a** est ensuite obtenu par ajout d'une solution d'éther diéthylique saturée d'acide chlorhydrique à une solution de l'amine libre **31a** dans l'éther diéthylique. La précipitation n'est pas directe et il est nécessaire de décanter plusieurs fois la solution résiduelle avant d'observer une bonne précipitation. Les composés **32a** et **31b** ont finalement été obtenus avec des rendements globaux de 4% et 5% sur 5 étapes.

II.3.8. Synthèse des analogues issus de la pharmacomodulation 7

Dans le cadre de cette étude, nous nous sommes intéressés à l'introduction de trois motifs acides aminés au sein de la chaîne centrale de nos composés (**Figure 47**).

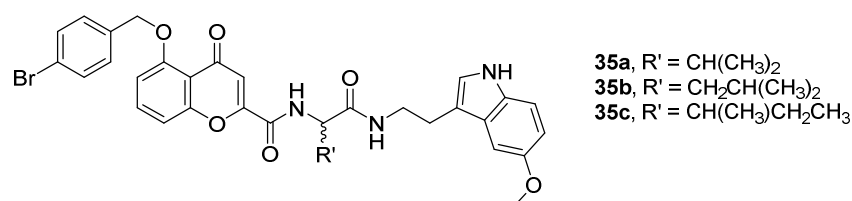


Figure 47 : Structures des composés **35a** à **35c**.

Ces dérivés ont été obtenus selon la voie de synthèse décrite sur le **Schéma réactionnel 14**.

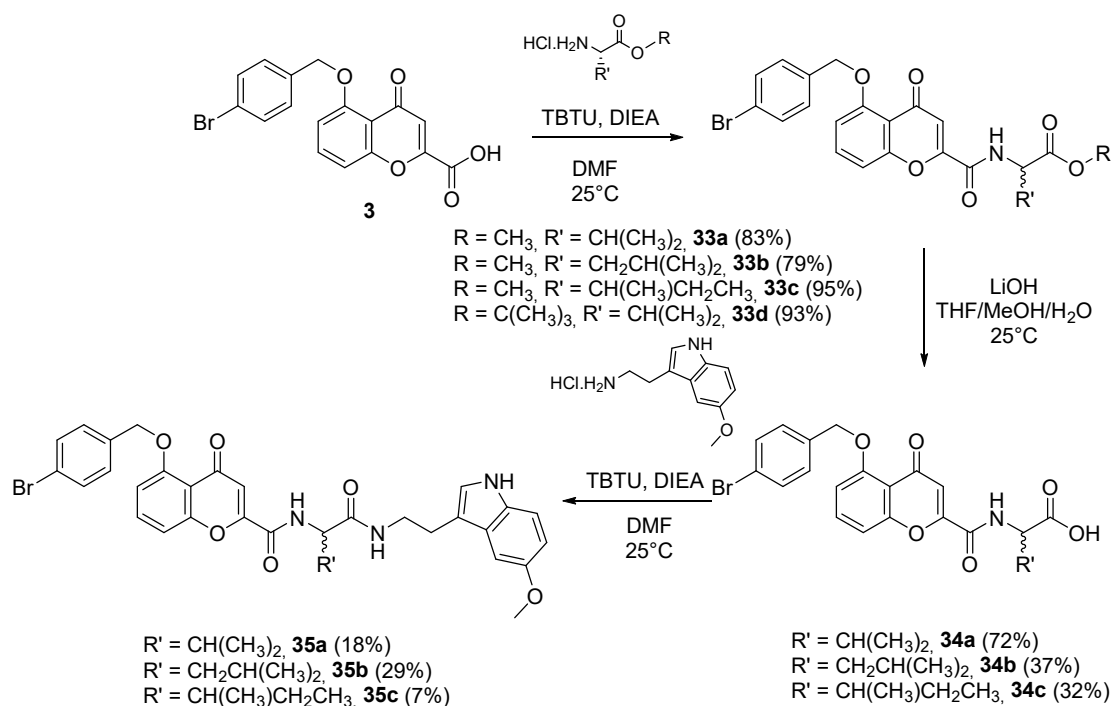


Schéma réactionnel 14 : Synthèse des dérivés **35a**, **35b** et **35c**.

Une première étape consiste à coupler l'acide **3** avec les esters des acides aminés commerciaux en présence de TBTU et de DIEA dans le DMF. Ces conditions de couplage, différentes de celles utilisées pour les autres analogues du **MBL-II-141**, conduisent aux composés **33a** à **33d** avec des rendements compris entre 79% et 95%. Les esters obtenus sont ensuite hydrolysés par action de l'hydroxyde de lithium dans un mélange méthanol/eau/THF afin de conduire aux acides correspondants **34a** à **34c** avec des rendements compris entre 32% et 72%. Pour finir ces acides carboxyliques sont eux-mêmes couplés avec la 5-méthoxytryptamine de nouveau en présence de TBTU et DIEA dans le DMF pour fournir les composés finaux **35a** à **35c** avec des rendements compris entre 7% et 29%.

Au total, 38 composés ont été synthétisés et testés au sein de l'Institut de Biologie et de Chimie des Protéines (IBCP) de l'Université Lyon 1. Les résultats et analyses de ces tests sont décrits dans les paragraphes suivants.

II.4. ÉVALUATION BIOLOGIQUE DES NOUVEAUX ANALOGUES DU MBL-II-141

II.4.1. Procédés d'évaluation biologique des analogues du MBL-II-141

Les différents tests biologiques ont été effectués à l'IBCP de Lyon au sein de l'équipe « Mécanisme et modulation de la résistance aux médicaments » dirigée par le Dr. Attilio Di Pietro. Ces tests ont été réalisés sur les lignées cellulaires HEK293 issues de cellules embryonnaires de rein humain (*Human Embryonic Kidney*) transfectées, soit avec le vecteur vide (HEK293-pcDNA3.1, appelées cellules sensibles), soit avec le vecteur contenant le gène codant pour ABCG2 (HEK293-ABCG2, appelées cellules résistantes). Certains de ces composés ont également été testés sur les lignées cellulaires H460 issues de cellules de cancer du poumon humain à grandes cellules (contrôle) et les cellules sélectionnées H460MX surexprimant ABCG2 et résistantes à la mitoxantrone. Différents tests ont été effectués afin de déterminer l'activité d'inhibition du transport de la mitoxantrone, leur cytotoxicité, leur sélectivité vis-à-vis d'ABCG2 et pour finir leurs activités ATPasiques.

II.4.1.1 *Évaluation de l'inhibition de l'activité de transport d'ABCG2*

On s'intéresse ici à l'étude de l'inhibition de l'efflux de la mitoxantrone, substrat d'ABCG2 fluorescent. Son accumulation intracellulaire est quantifiée par cytométrie de flux sur les deux lignées sensibles (HEK293-pcDNA3.1 ou H460) et résistantes (HEK293-ABCG2 ou H460MX). L'inhibiteur de référence est le Ko143 qui permet d'obtenir une inhibition de 100%.

Une première phase d'incubation est mise en œuvre pendant laquelle la mitoxantrone (5 μ M) s'accumule au sein des cellules pendant 30 min à 37°C en présence ou en absence de concentrations variables en composés inhibiteurs testés. Les cellules contrôles (HEK293-pcDNA3.1 ou H460) accumulent une quantité donnée de mitoxantrone tandis qu'au sein des cellules ABCG2-positives (HEK293-ABCG2 ou H460MX), le transporteur évacue le substrat fluorescent et induit une diminution de son accumulation intracellulaire et donc une diminution de la fluorescence globale de la cellule. L'incubation avec un inhibiteur donné bloque l'efflux de la mitoxantrone et ainsi induit une augmentation de la fluorescence des cellules ABCG2 positives. La fluorescence intracellulaire correspondant à la quantité de mitoxantrone non effluée est ensuite déterminée par cytométrie de flux. À partir de ces résultats expérimentaux, le pourcentage d'inhibition est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{inhibition} = \frac{C-M}{C_{ev}-M} \times 100$$

Formule 1: Calcul du pourcentage d'inhibition. C correspond à la fluorescence intracellulaire des cellules résistantes (HEK293-ABCG2 ou H460MX) en présence de composés testés et de mitoxantrone, M correspond à la fluorescence intracellulaire des cellules résistantes en présence uniquement de la mitoxantrone et C_{ev} correspond à la fluorescence intracellulaire des cellules contrôles (HEK293-pcDNA3.1 ou H460) en présence de composés testés et de la mitoxantrone.

Pour chacun des composés testés, des concentrations croissantes des dérivés testés, de 5 à 10 μ M, ont été ajoutées et les EC_{50} ont été évaluées. Ces valeurs ont été déterminées à partir des courbes d'accumulation intracellulaire de la mitoxantrone en fonction de la concentration en inhibiteur.

II.4.1.2 Détermination de la cytotoxicité

La cytotoxicité des composés testés a été évaluée par le test de viabilité cellulaire, MTT. Après incubation avec les composés testés, le MTT (sel de bromure de 3-(4,5-diméthyl-2-thiazolyl)-2,5-diphényl-2*H*-tétrazolium) est ajouté en excès sur les cellules contrôles (HEK293-pcDNA3.1). Dans les cellules viables, ce réactif de couleur jaune est réduit par la succinate déshydrogénase mitochondriale sous forme de cristaux violets de formazan. Après dissolution, l'absorbance correspondant au formazan ($\lambda = 570$ nm) est mesurée par spectrophotométrie (**Figure 48**). Plus les cellules viables seront nombreuses, plus le MTT aura été réduit en formazan et plus l'absorbance à 570 nm sera élevée. En prenant pour référence un témoin contenant du solvant représentant 100% de viabilité, il est ainsi possible d'évaluer le pourcentage de survie des cellules traitées. Plusieurs concentrations de chaque composé sont testées et il est ainsi possible d'étudier la survie cellulaire en fonction de la concentration du composé testé.

D'un point de vue expérimental, les cellules sont incubées pendant une nuit puis traitées avec des concentrations croissantes de composés testés pendant 72 h à 37°C.

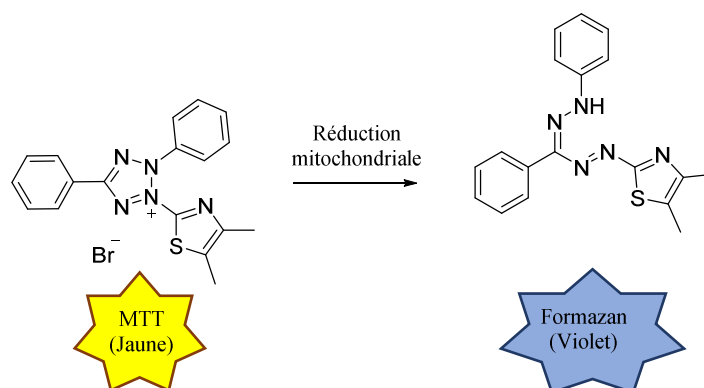


Figure 48 : Principe du test MTT.

II.4.1.3 Évaluation de la sélectivité vis-à-vis de la P-gp et MRP1

La sélectivité des composés pour ABCG2, relativement à la P-gp et à MRP1, a été étudiée sur deux lignées cellulaires :

- la lignée NIH-3T3, issue de cellules murines embryonnaires transfectées pour exprimer ABCB1 (P-gp) incubées en présence de rhodamine 123 (0,5 μ M), substrat de la P-gp ;

- la lignée HEK293 transfectée pour exprimer ABCC1 (MRP1), incubée en présence de calcéine-AM (0,2 μ M), substrat de MRP1.

Ces lignées cellulaires ont ainsi été incubées 30 min à 37°C en présence de leur substrat respectif ainsi qu'en présence ou absence des composés testés, à 1 et 5 μ M. Comme précédemment, la fluorescence intracellulaire correspondant à la quantité de substrat non efflué a été déterminée par cytométrie de flux. Les pourcentages d'inhibition ont été calculés par rapport aux inhibiteurs de référence de la P-gp (5 μ M d'élacridar) et de MRP1 (35 μ M de vérapamil).

II.4.1.4 Détermination des activités ATPasiques

Les transporteurs ABC utilisent l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP afin d'assurer leur fonction de transporteur. Cette réaction implique une molécule d'ATP et une molécule d'eau pour conduire à la production d'une molécule d'ADP et d'une molécule de phosphate inorganique (Pi). Ainsi, la quantification du phosphate inorganique libéré après un temps donné d'incubation permet de déterminer la vitesse de réaction correspondant à l'activité du transporteur. Le phosphate inorganique (Pi) pouvant réagir avec le molybdate d'ammonium afin de produire une intense coloration détectable par UV, cette mesure est donc un moyen fiable pour détecter les interactions existantes entre différents composés et la protéine ABCG2 et pour indiquer la nature de ces interactions (**Figure 49**).

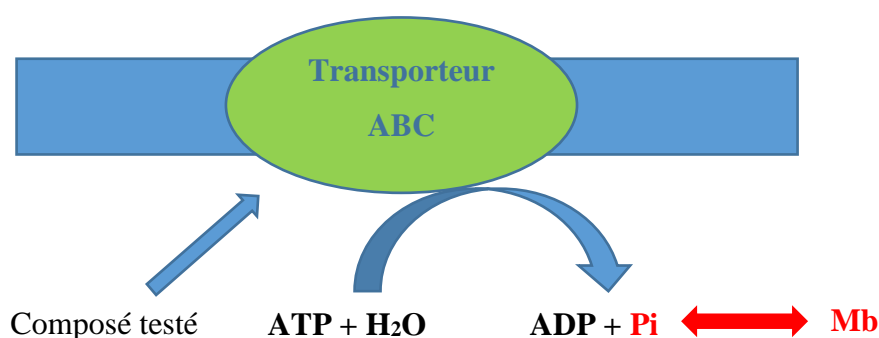


Figure 49 : Représentation schématique de la mesure de l'activité ATPasique.

L'activité ATPasique se mesure à partir de préparations membranaires issues de cellules ovariennes de *Spodoptera frugiperda* (Sf9) infectées préalablement par un baculovirus permettant la surexpression d'ABCG2, préparées et conservées avec du cholestérol à 2 mM.

Ces membranes (10 µg de protéine) ont ainsi été incubées en présence des composés testés (2 µM), avec et sans orthovanadate de sodium (0,33 mM), un inhibiteur de l'ATPase. Ainsi, la différence entre l'activité ATPasique avec l'orthovanadate de sodium et l'activité ATPasique obtenue sans orthovanadate de sodium constitue l'activité ATPasique spécifique du transporteur.

La réaction d'hydrolyse de l'ATP est initiée par l'ajout de MgATP (3,9 µM). Après une incubation de 30 minutes à 37°C, le phosphate inorganique est révélé par un mélange molybdate d'ammonium/acide ascorbique (1:4) et l'absorbance est mesurée à 880 nm (valeur d'absorbance du composé bleu formé) après 30 minutes à 25°C. Cette réaction permet de mesurer la quantité de phosphate libéré pendant l'hydrolyse de l'ATP issu de l'activité du transporteur. Une gamme de phosphate effectuée dans les mêmes conditions permet d'extrapoler la concentration en phosphate inorganique de chaque échantillon et donc de mesurer l'activité ATPasique du transporteur. Les résultats sont exprimés en nmoles de phosphate libéré par mg de protéines et par minutes.

A l'issue de cette expérience, deux activités ATPasiques sont déterminées :

- **l'activité ATPasique basale** qui constitue l'activité ATPasique observée sans transport de substrat ;
- **l'activité ATPasique couplée** observée en présence de 0,2 µM de quercétine, substrat d'ABCG2.

Les résultats biologiques issus de ces différents tests pour chacune des pharmacomodulations réalisées sont détaillés dans les paragraphes suivants.

II.4.2. Relations structure-activité (RSA) issues de la pharmacomodulation 1 : modulation de la position du groupement *para*-bromobenzyloxy porté par la chromone

Une première pharmacomodulation envisagée dans le cadre de ce projet a été le déplacement du groupement porté par la chromone en position 6 (composé **7a**) et en position 7 (composé **7b**) (**Figure 50**).

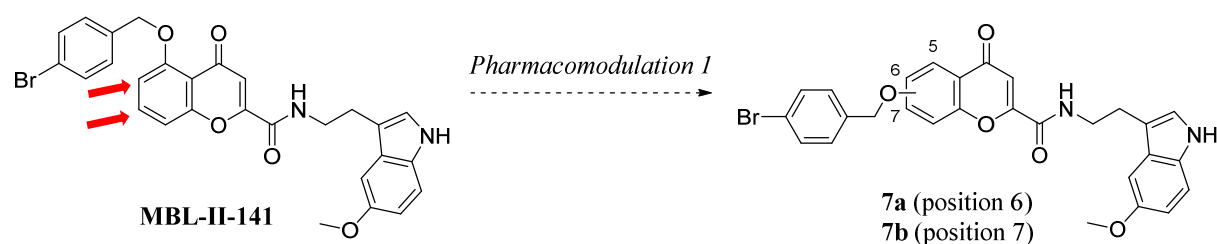


Figure 50 : Modulation de la position du groupement benzyloxy porté par la chromone.

Les valeurs obtenues pour l'inhibition de l'efflux de la mitoxantrone sur les cellules transfectées HEK293-ABCG2 et les cellules sélectionnées H460MX, ainsi que pour la cytotoxicité sont résumées dans le **Tableau 6**.

Référence	Position du groupement benzyloxy	Cellules transfectées		Cellules sélectionnées		Cytotoxicité IG ₅₀ (μM)
		HEK293		H460MX		
		Inhibition maximale (%)	EC ₅₀ (μM)	Inhibition maximale (%)	EC ₅₀ (μM)	
MBL-II-141	5	98 ± 5	0,13 ± 0,09	107 ± 11	0,05 ± 0,01	> 100
7a	6	108 ± 27	0,3 ± 0,1	109 ± 9	0,10 ± 0,02	> 100
7b	7	80 ± 5	1,3 ± 0,6	93 ± 8	1,5 ± 0,2	> 100

Tableau 6 : Inhibition de l'efflux de la mitoxantrone sur les cellules ABCG2 transfectées surexprimant ABCG2 (HEK293-ABCG2) et les cellules sélectionnées H460MX et étude de la cytotoxicité des composés **7a** et **7b**. Les valeurs représentent la moyenne ± la déviation standard sur un minimum de trois expériences indépendantes.

La position du groupement benzyloxy en position 5 semble être nécessaire afin d'assurer une forte inhibition. En effet, par rapport au **MBL-II-141**, un déplacement de ce groupement en position 6 et 7 entraîne une baisse de l'inhibition d'un facteur 2 et 10 respectivement sur les cellules transfectées HEK293-ABCG2 et d'un facteur 2 et 31 sur les cellules sélectionnées H460MX. Néanmoins, le déplacement du bromobenzyl n'a pas entraîné de toxicité cellulaire, même à forte concentration (100 μM).

CHAPITRE 2. MODULATION DE LA PROTÉINE ABCG2

La sélectivité du composé **7a** a également été évaluée et tout comme le **MBL-II-141**, ce composé est sélectif pour ABCG2. En effet, à 1 et 5 μM , il n'est pas capable d'inhiber l'activité d'efflux ni de la rhodamine 123 *via* la P-gp, ni de la calcéine-AM *via* MRP1 (valeurs de pourcentage d'inhibition obtenues proche de 0).

Les activités ATPasiques basale et couplée obtenues pour les composés **7a** et **7b** sont présentées dans le **Tableau 7**.

Référence	% Activité ATPasique basale	Inhibition activité ATPasique couplée EC ₅₀ (μM)
MBL-II-141	62 \pm 17	0,38
Ko143	26 \pm 32	0,17
Quercetine	420 \pm 24	/
Nilotinib	323 \pm 4	/
Prazosine	243 \pm 24	/
7a	92 \pm 4	0,53
7b	211 \pm 24	0,01

Tableau 7 : Activités ATPasiques basale et couplée des composés **7a** et **7b**. L'activité ATPasique basale est mesurée également pour **MBL-II-141**, Ko143 et différents substrats transportés : quercétine (2 μM), nilotinib (0,1 μM) et prazosine (20 μM).

Il est intéressant de noter que le déplacement du groupement benzyloxy en position 6 (composé **7a**) induit une baisse de l'inhibition de l'activité ATPasique basale en accord avec le fait que l'on observe une légère baisse de l'EC₅₀ pour l'efflux de la mitoxantrone. En revanche, son déplacement en position 7 entraîne une stimulation de l'activité ATPasique basale (2,1 fois), de manière similaire à des substrats transportés tels que la quercétine (4,1 fois), le nilotinib (3,2 fois) ou la prazosine (2,4 fois). À ceci vient s'ajouter le fait que le composé **7b** présente une inhibition de l'activité ATPasique couplée beaucoup plus forte que celle observée pour le **MBL-II-141**, le Ko143 ou le composé **7a**, avec une EC₅₀ respectivement 38, 17 et 53 fois plus faible. Ces résultats peuvent être corrélés au profil de substrat et non d'inhibiteur du composé **7b** bien qu'aucune preuve concrète n'a pu permettre de prouver ou non le transport du composé **7b** *via* ABCG2.

II.4.3. RSA issues de la pharmacomodulation 2 : modulation de la nature et de la position du groupement sur le cycle benzyloxy

II.4.3.1 Résultats antérieurs

Comme nous l'avons déjà abordé dans les paragraphes précédents, la comparaison des analogues du **MBL-II-141** modulés en *para* du cycle benzyloxy tend à montrer l'importance d'un atome de brome sur cette position (**Tableau 8**).²³⁸

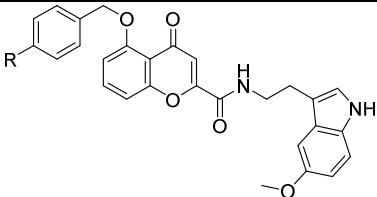
			
Référence	R	EC ₅₀ (μM)	Cytotoxicité IG ₅₀ (μM)
Chromone 6f	H	0,18	35
MBL-II-141	Br	0,13 ± 0,09	>100

Tableau 8 : Études antérieures de modulation de la nature de la substitution en *para* du groupement benzyloxy. Activités inhibitrices (EC₅₀) correspondantes (Inhibition de l'efflux de la mitoxantrone au sein de cellules transfectées surexprimant ABCG2) et étude de la cytotoxicité. Résultats issus des travaux de Valdameri.²³⁹

À la lecture de ces résultats, alors que le **MBL-II-141** et le composé **6f** sont équivalents en termes d'inhibition du transport de la mitoxantrone, l'introduction du brome permet de réduire considérablement la cytotoxicité. La présence d'un halogène étant bénéfique pour les caractéristiques pharmacochimiques, nous avons jugé opportun d'étudier l'influence et la position de l'halogène sur le groupement benzyloxy.

II.4.3.2 Influence de la nature et de la position de l'halogène

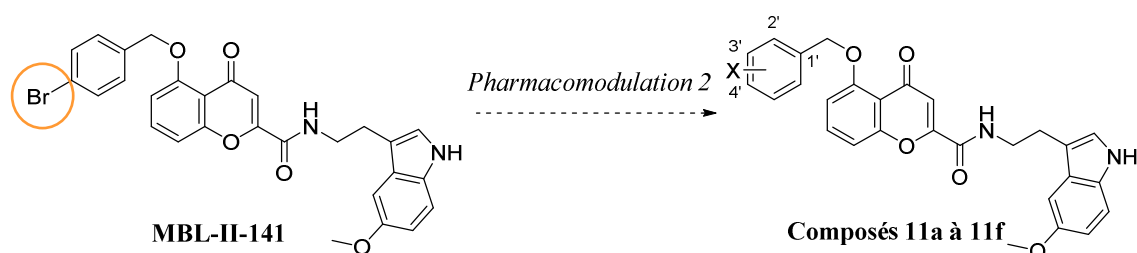
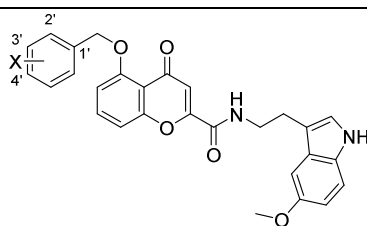


Figure 51 : Modulation de la nature et de la position de l'halogène sur le cycle benzyloxy.

Dans un premier temps, nous avons déplacé le brome sur les positions *ortho* et *méta* du groupement benzyloxy (composés **11a** et **11b**) (**Figure 51**). Par la suite, nous avons substitué l'atome de brome par un atome de fluor tout en étudiant l'influence de sa position sur les caractéristiques pharmacocinétiques (composés **11c**, **11d** et **11e**). Nous avons également choisi de synthétiser un analogue difluoré (composé **11f**). En effet, le fluor est largement utilisé comme groupement de choix en chimie médicinale. Sa présence peut permettre d'améliorer la stabilité métabolique, de moduler les propriétés physicochimiques telles que la lipophilie et d'augmenter l'affinité vis-vis d'une protéine donnée.²⁵¹

L'ensemble des résultats obtenus pour cette nouvelle série de pharmacomodulations est présenté sur le **Tableau 9**.



Référence	X	Position	Cellules transfectées		Cytotoxicité IG ₅₀ (μM)
			HEK293		
			% inhibition maximale	EC ₅₀ (μM)	
MBL-II-141	Br	4'	98 ± 5	0,13 ± 0,09	>100
11a	Br	2'	103 ± 10	0,09 ± 0.02	>100
11b	Br	3'	98 ± 8	0,54 ± 0,05	e.c.
11c	F	2'	129 ± 4	0,556 ± 0,009	94 ± 1
11d	F	3'	107 ± 3	0,19 ± 0,03	e.c.
11e	F	4'	106 ± 4	0,13 ± 0,03	e.c.
11f	F	3',4'	140 ± 3	0,63 ± 0,02	9,9 ± 0,2

Tableau 9 : Inhibition de l'efflux de la mitoxantrone sur les cellules ABCG2 transfectées surexprimant ABCG2 (HEK293-ABCG2) et étude de la cytotoxicité des composés **11a** à **11f**. Les valeurs représentent la moyenne ± la déviation standard sur un minimum de trois expériences indépendantes. e.c. = en cours.

À la lecture de ces résultats, on remarque que le déplacement de l'atome de brome en position 2' conduit à une activité inhibitrice équivalente à celle du **MBL-II-141**. Une légère baisse (d'un facteur 4) est observée pour le composé **11b** dont le brome est en position 3'. Ainsi, la position de l'atome de brome sur le groupement benzyloxy influence peu le pouvoir inhibiteur. De plus, nous pouvons observer que les analogues fluoré en position 3' (composé **11d**) et en 4' (composé **11e**) possèdent le même profil inhibiteur que le chef de file. Le déplacement de l'atome de fluor en *ortho* (composé **11c**) entraîne quant à lui une légère baisse de l'activité inhibitrice d'un facteur 4,3. Ceci tend ainsi à montrer que la taille et la position de l'halogène sur le cycle benzyloxy ne sont pas restrictives et qu'aucune corrélation ne peut être faite entre ces deux paramètres. Pour finir, l'introduction de deux atomes de fluor en position 3' et 4' (composé **11f**) conduit également à la diminution de l'activité inhibitrice d'un facteur 5.

Les composés **11a** et **11c** présentant respectivement des atomes de brome et de fluor en position 2' sont dépourvus de cytotoxicité vis-à-vis des lignées contrôles surexprimant ABCG2. Cette position semble ainsi importante pour la cytotoxicité. Le dérivé difluoré se

révèle quant à lui beaucoup plus cytotoxique. Les tests de cytotoxicité des composés **11b**, **11d** et **11e** sont actuellement en cours.

Les tests de sélectivité et l'étude des activités ATPasiques basale et couplée sont également en cours d'étude pour l'ensemble de ces composés. Cependant, ces premiers résultats d'inhibition de l'efflux de la mitoxantrone ainsi que de cytotoxicité suggèrent fortement la découverte d'un nouveau composé chef de file, le composé **11a**, équivalent au **MBL-II-141**.

II.4.3.3 Introduction d'un groupement méthoxylé

La substitution du groupement brome par un groupement méthoxy a également été entreprise (composé **16**). D'un point de vue stérique, le groupement méthoxy est équivalent au brome. De plus, il s'agit d'un groupement accepteur de liaison hydrogène, nous permettant ainsi d'étudier si une liaison hydrogène permet de favoriser l'interaction avec la protéine ABCG2. L'activité inhibitrice de l'efflux de la mitoxantrone du composé **16** figure dans le **Tableau 10**.

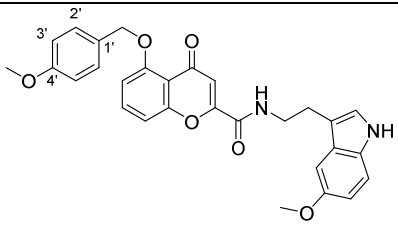
		
Référence	Cellules transfectées HEK293	
	% inhibition maximale	EC ₅₀ (μM)
MBL-II-141	98 ± 5	0,13 ± 0,09
16	100 ± 7	0,83 ± 0,07

Tableau 10 : Inhibition de l'efflux de la mitoxantrone sur les cellules ABCG2 transfectées surexprimant ABCG2 (HEK293-ABCG2) du composé **16**. Les valeurs représentent la moyenne ± la déviation standard sur un minimum de trois expériences indépendantes.

La présence d'un groupement méthoxy en position 4' du benzyloxy entraîne une perte de l'inhibition d'un facteur 6 par rapport au **MBL-II-141**. Ceci suggère ainsi que la présence d'un groupement accepteur de liaison hydrogène en cette position tend à être légèrement défavorable pour l'activité inhibitrice.

Les tests de cytotoxicité et de sélectivité et la détermination des activités ATPasique du composé **16** sont actuellement en cours d'évaluation biologique.

II.4.4. RSA issues de la pharmacomodulation 3 : modulation de la nature et de la position de la substitution du groupement porté par le cycle indolique

Inspirés de travaux antérieurs, nous avons décidé d'explorer le rôle du groupement méthoxy porté par le noyau indolique du **MBL-II-141**.²²⁶

Dans le cadre de cette étude, le groupement méthoxy du **MBL-II-141** a été remplacé par un atome d'hydrogène (composé **17a**), un groupement hydroxy (composé **17b**), éthyloxy (composé **17c**), propyloxy (composé **17d**) et isopropyloxy (composé **17e**). Enfin, le groupement méthoxy a été déplacé de la position 5 à la position 6 (composé **17f**) (**Figure 52**).

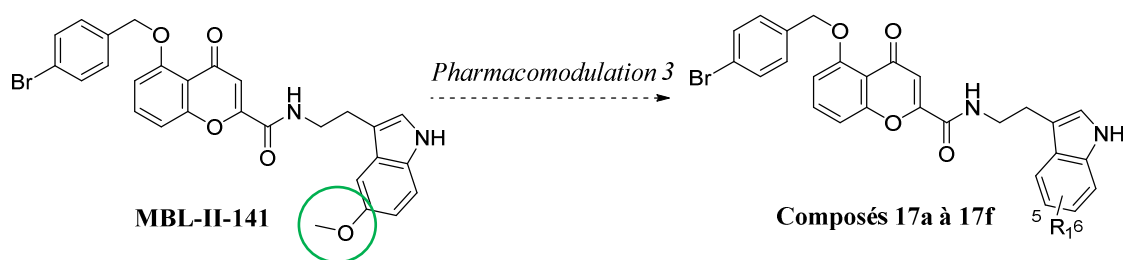
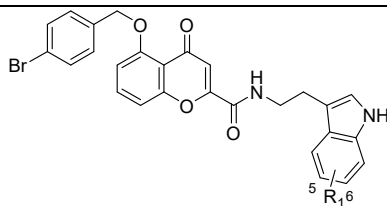


Figure 52 : Modulation de la nature de la substitution en position 5 de l'indole.

L'ensemble des résultats obtenus pour cette famille de composés modulés sur le cycle indolique est résumé dans le **Tableau 11**.



Référence	Position	R ₁	Cellules transfectées		Cellules sélectionnées		Cytotoxicité IG ₅₀ (μM)
			HEK293		H460MX		
			Inhibition		Inhibition		
			maximale %	EC ₅₀ (μM)	maximale %	EC ₅₀ (μM)	
MBL-II-141	5	OCH ₃	98 ± 5	0,13 ± 0,09	107 ± 11	0,05 ± 0,01	>100
17a	5	H	97 ± 10	1,0 ± 0,2.	e.c.	e.c.	e.c.
17b	5	OH	104 ± 7	4,3 ± 0,5	e.c.	e.c.	e.c.
17c	5	OCH ₂ CH ₃	/	0,18 ± 0,01	/	/	e.c.
17d	5	O(CH ₂) ₂ CH ₃	/	0,14 ± 0,02	/	/	e.c.
17e	5	OCH(CH ₃) ₂	/	0,18 ± 0,01	/	/	e.c.
17f	6	OCH ₃	97 ± 30	0,10 ± 0,03	89 ± 5	0,08 ± 0,04	5,3 ± 0,1

Tableau 11 : Inhibition de l'efflux de la mitoxantrone sur les cellules ABCG2 transfectées surexprimant ABCG2 (HEK293-ABCG2) et les cellules sélectionnées H460MX et étude de la cytotoxicité des composés **17a** à **17f**. Les valeurs représentent la moyenne ± la déviation standard sur un minimum de trois expériences indépendantes. e.c. = en cours.

La suppression du groupement méthoxy en position 5 de l'indole entraîne une diminution d'un facteur 8 de l'activité inhibitrice montrant ainsi l'importance du rôle joué par un groupement hydrophobe en cette position. Ceci est d'autant plus confirmé par le composé **17b**, possédant un groupement hydrophile et conduisant à une activité inhibitrice 33 fois inférieure à celle du **MBL-II-141**. Les composés **17c**, **17d**, **17e** et **17f** présentent quant à eux des valeurs d'EC₅₀ équivalentes au **MBL-II-141**.

Nous pouvons ainsi conclure que la présence d'un groupement hydrophobe au niveau du cycle indolique joue un rôle dans le maintien de l'activité inhibitrice du transport de mitoxantrone. Nous pouvons également conclure que la position 5 de l'indole est tolérante d'un point de vue stérique. En effet, cette position accueille aussi bien un groupement méthoxy qu'un groupement propyloxy ou isopropyloxy.

Le composé **17f**, équivalent à notre chef de file en termes d'inhibition, est l'unique composé de la série dont les tests biologiques ont été approfondis. Ce composé est sélectif d'ABCG2

vis-à-vis de la P-gp et à MRP1. Cependant, il se révèle être bien plus toxique que le **MBL-II-141** (Tableau 11).

Ainsi, au vu des résultats obtenus, la substitution par un groupement méthoxylé en position 5 du cycle indolique reste à l'heure actuelle le meilleur compromis en termes de relations structure-activité.

II.4.5. RSA issues de la pharmacomodulation 4 : méthylation des azotes indolique et amidique

Afin d'étudier l'influence du caractère donneur/accepteur des liaisons N-H sur le profil pharmacologique, nous nous sommes intéressés à la méthylation des azotes indolique et amidique de notre chef de file.

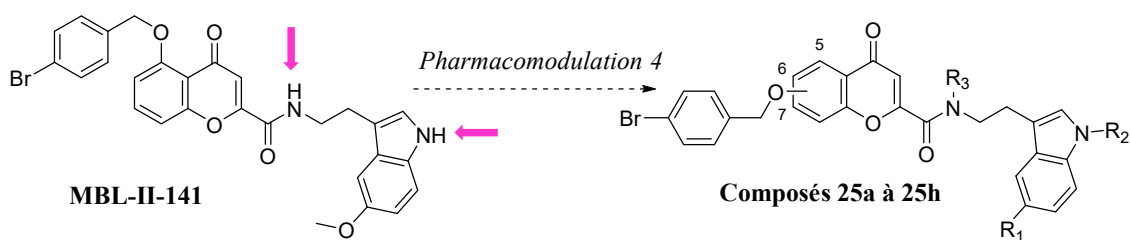
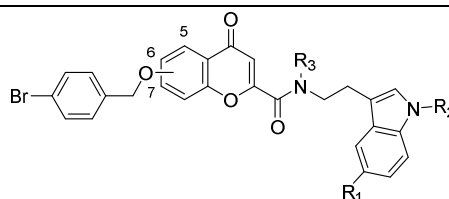


Figure 53: Méthylation des azotes amidique et indolique.

Une première série de composés dépourvus de substituant sur le cycle indolique ($R_1 = H$, composés **25a**, **25b** et **25c**) a été synthétisée, suivie des dérivés présentant un groupement méthoxy en position 5 ($R_1 = OCH_3$, composés **25d**, **25e** et **25f**).

En parallèle, nous avons entrepris la synthèse d'analogues *N*-méthylés sur les azotes amidique et indolique pour la série portant le groupement benzyloxy en position 6 (composés **25g** et **25h**) et sans substitution sur la partie indolique.

Les résultats d'inhibition de l'efflux de la mitoxantrone *via* ABCG2 ainsi que de cytotoxicité sont rassemblés dans le **Tableau 12**.



Référence	Position	R ₁	R ₂	R ₃	Cellules transfectées		Cellules sélectionnées		Cytotoxicité IG ₅₀ (μM)
					HEK293		H460MX		
					Inhibition		Inhibition		
					maximale %	EC ₅₀ (μM)	maximale %	EC ₅₀ (μM)	
MBL-II-141	5	OCH ₃	H	H	98 ± 5	0,13 ± 0,09	107 ± 11	0,05 ± 0,01	>100
25a	5	H	H	CH ₃	105 ± 29	1,11 ± 0,05	89 ± 9	0,57 ± 0,06	21 ± 2
25b	5	H	CH ₃	H	85 ± 5	0,30 ± 0,01	102 ± 8	0,22 ± 0,03	16 ± 3
25c	5	H	CH ₃	CH ₃	88 ± 11	1,0 ± 0,3	84 ± 12	0,50 ± 0,05	18,1 ± 0,2
25d	5	OCH ₃	H	CH ₃	101 ± 20	0,96 ± 0,03	96 ± 4	0,5 ± 0,2	>100
25e	5	OCH ₃	CH ₃	H	109 ± 8	0,22 ± 0,08	/	/	e.c.
25f	5	OCH ₃	CH ₃	CH ₃	111 ± 6	0,7 ± 0,2	/	/	e.c.
25g	6	H	H	CH ₃	54 ± 16	2,6 ± 0,6	50 ± 5	1,7 ± 0,4	25 ± 5
25h	6	H	CH ₃	CH ₃	50 ± 15	2,1 ± 0,5	61 ± 1	2,2 ± 0,5	33 ± 5

Tableau 12 : Inhibition de l'efflux de la mitoxantrone sur les cellules HEK293-ABCG2 et sur les cellules H460MX sélectionnées et étude de la cytotoxicité des composés **25a** à **25h**. Les valeurs représentent la moyenne ± la déviation standard sur un minimum de trois expériences indépendantes.

En comparaison avec le **MBL-II-141**, une diminution plus ou moins importante du pouvoir inhibiteur est observée pour l'ensemble des composés synthétisés sur les lignées transfectées HEK293-ABCG2 et sélectionnées H460MX.

Une baisse plus importante de l'activité inhibitrice a été observée lors de la mono-méthylation de l'azote amidique central. En effet, cette simple modification de structure conduit à une diminution de 9 à 11 fois de l'activité inhibitrice sur les cellules HEK293-ABCG2 et d'environ 11 fois sur les cellules sélectionnées H460MX respectivement pour les composés **25d** et **25a**. Un tel effet négatif semble s'additionner à celui induit par le déplacement du cycle benzyloxy en position 6. En effet, autant sur les lignées transfectées que sur les lignées sélectionnées, le pourcentage d'inhibition maximale est limité à 50-61% pour les composés **25g** et **25h**. Une diminution de l'activité inhibitrice est également observée (de 21 à 26 fois sur HEK293-ABCG2 et de 33 à 43 fois sur H460MX).

CHAPITRE 2. MODULATION DE LA PROTÉINE ABCG2

La méthylation de l'azote indolique, quant à elle, conduit à des résultats tout de même intéressants, respectivement pour les composés **25e** et **25b** sur les lignés transfectées. Cependant ceci ne parvient pas à contrebalancer l'effet négatif produit par la méthylation de l'azote amidique au sein des composés **25c** et **25f** qui présentent des EC₅₀ 7 à 10 fois inférieures au **MBL-II-141** sur les cellules transfectées et 10 fois inférieures pour le composé **25c** chez les cellules sélectionnées.

Concernant l'étude de cytotoxicité, les composés **25a**, **25b**, **25c**, **25g** et **25h** présentent une toxicité plus élevée que le **MBL-II-141**. Cependant, pour le composé **25d**, seul composé en série méthoxylée à avoir été testé pour la cytotoxicité, on assiste cette fois-ci à une perte totale de cytotoxicité soulignant l'effet bénéfique du groupement méthoxy porté par l'indole. Les tests de toxicité des composés **25e** et **25f** sont actuellement en cours.

Concernant la sélectivité pour ABCG2 vis-à-vis de la P-gp et MRP1, uniquement les composés **25a**, **25b**, **25c** et **25d** ont été testés. Ces composés présentent des pourcentages d'inhibition de l'efflux de la rhodamine 123 (pour la P-gp) et de la calcéine-AM (pour MRP1) inférieurs à 8,3%. Ces composés sont ainsi sélectifs pour ABCG2. Les tests de sélectivité des composés **25e**, **25f**, **25g** et **25h** sont actuellement en cours.

Les activités ATPasique basale et couplée ont également été déterminées pour ces composés et sont rassemblées dans le **Tableau 13**.

Référence	% Activité ATPasique basale	Inhibition activité ATPasique couplée EC ₅₀ (μM)
MBL-II-141	62 ± 17	0,38
Ko143	26 ± 32	0,17
Quercetine	420 ± 24	/
Nilotinib	323 ± 4	/
Prazosine	243 ± 24	/
25a	39 ± 10	> 2
25b	57 ± 14	1,1
25c	58 ± 10	> 2
25d	26 ± 3	> 2
25e	e.c.	e.c.
25f	e.c.	e.c.
25g	88 ± 17	> 2
25h	70 ± 29	> 2

Tableau 13 : Activités ATPasiques basale et couplée des composés **25a** à **25h**. L'activité ATPasique basale est mesurée également pour **MBL-II-141**, Ko143 et différents substrats transportés : quercétine (2 μM), nilotinib (0,1 μM) et prazosine (20 μM).

L'ensemble des composés semblent inhiber l'activité ATPasique basale, tout comme le **MBL-II-141** ou le Ko143. Cependant, une *N*-méthylation de l'amide central, au sein des composés **25a**, **25c**, **25d**, **25g** et **25h**, semble être défavorable à l'inhibition de l'activité ATPasique couplée (EC₅₀ > 2). Ceci corrèle avec la diminution d'activité inhibitrice observée sur ABCG2.

Il est tout de même intéressant de noter que, par rapport au **MBL-II-141**, les composés **25a** à **25d** inhibent plus l'activité ATPasique basale tout en inhibant moins l'activité ATPasique couplée. Or l'activité inhibitrice de ces quatre composés sur le transporteur est globalement amoindrie ce qui peut sous-entendre une dualité d'action/d'interaction avec la protéine ABCG2. Nous pouvons tout de même conclure sur cette série que la suppression du caractère donneur de proton des liaisons N-H amidique et indolique entraîne une baisse de l'activité inhibitrice.

II.4.6. RSA issues de la pharmacomodulation 5 : introduction d'un cycle triazolique

Les composés portant un hétérocycle de nature triazolique jouent un rôle important en chimie médicinale. En effet, le groupement triazole est capable de se lier à un grand nombre d'enzymes et de récepteurs biologiques *via* diverses interactions non covalentes.²⁵² De plus, de nouveaux composés portant un cycle triazolique se sont révélés être de très bons inhibiteurs de la protéine P-gp.²⁵³ Ainsi, nous avons décidé d'introduire un motif triazole au sein de la chaîne centrale de notre structure afin d'en étudier l'impact sur le profil pharmacologique. Différents groupements R ont été introduits tels que des cycles benzéniques, substitués ou non, et un cycle indolique, important pour l'activité biologique (Figure 54).

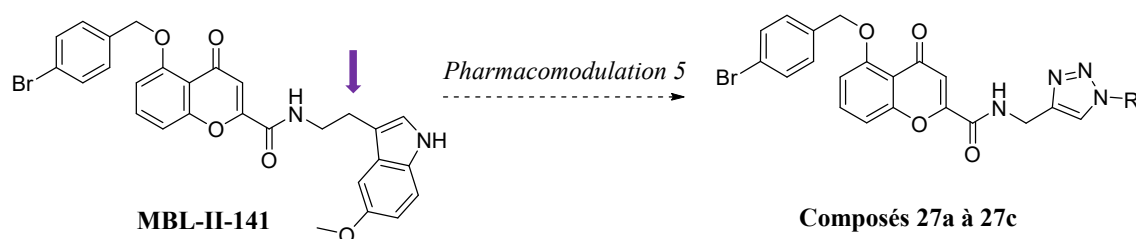


Figure 54 : Introduction d'un cycle indolique au sein de nos structures.

Les résultats biologiques obtenus pour ces composés sont résumés dans le **Tableau 14**.

CHAPITRE 2. MODULATION DE LA PROTÉINE ABCG2

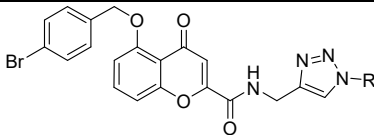
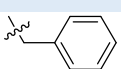
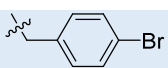
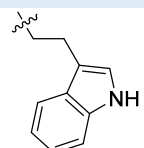
<div></div>						
Référence	R	Cellules transfectées		Cellules sélectionnées		Cytotoxicité IG ₅₀ (μM)
		HEK293		H460MX		
		Inhibition maximale %	IC ₅₀ (μM)	Inhibition maximale %	IC ₅₀ (μM)	
MBL-II-141	/	98 ± 5	0,13 ± 0,09	107 ± 11	0,05 ± 0,01	>100
27a		78 ± 9	1,5 ± 0,7	76 ± 13	0,5 ± 0,1	10 ± 7
27b		95 ± 17	0,57 ± 0,01	76 ± 6	0,71 ± 0,04	0,7 ± 0,1
27c		87 ± 17	0,49 ± 0,03	86 ± 3	0,5 ± 0,1	5,20 ± 0,04

Tableau 14 : Inhibition de l'efflux de la mitoxantrone sur les cellules transfectées surexprimant ABCG2 (HEK293-ABCG2) et sur les cellules H460MX sélectionnées et étude de la cytotoxicité des composés **27a** à **27c**. Les valeurs représentent la moyenne ± la déviation standard sur un minimum de trois expériences indépendantes.

L'introduction d'un cycle triazolique au sein de nos structures tend à montrer le rôle bénéfique joué par l'indole pour obtenir une activité inhibitrice. D'une part, la modification de sa position par l'introduction d'un triazole au sein du bras espaceur (composé **27c**) conduit à une activité inhibitrice 4 fois inférieure à celle du **MBL-II-141** sur les cellules transfectées et 9 fois inférieure sur les cellules sélectionnées. Au sein des cellules transfectées, le remplacement du cycle indolique par un groupement phényle dans le composé **27a** conduit à une forte diminution de l'inhibition alors qu'un effet plus modéré est observé pour le composé **27b** présentant un groupement *para*-bromobenzyle. L'inverse est observé au sein des cellules sélectionnées. Ici, nous retiendrons surtout le fait que, sur les cellules sélectionnées, l'introduction d'un cycle de nature triazolique se traduit par une baisse de l'activité inhibitrice d'un facteur 10 à 15. De plus, cette pharmacomodulation induit une augmentation importante de la cytotoxicité par rapport au chef de file.

Ainsi, l'ajout d'un tel cycle présente le seul bénéfice d'introduire des azotes basiques permettant, si on le souhaite, de salifier les produits synthétisés en vue d'améliorer leur hydrosolubilité. Les sels correspondant seraient moins actifs que le **MBL-II-141** mais avec

CHAPITRE 2. MODULATION DE LA PROTÉINE ABCG2

une meilleure hydrosolubilité, paramètre critique du chef de file restant à améliorer dans l'avenir.

Les résultats obtenus pour les activités ATPasiques basale et couplée sont résumées dans le **Tableau 15**.

Référence	% Activité ATPasique basale	Inhibition activité ATPasique couplée EC ₅₀ (μM)
MBL-II-141	62 ± 17	0,38
Ko143	26 ± 32	0,17
27a	72 ± 26	0,43
27b	73 ± 17	0,93
27c	43 ± 4	0,25

Tableau 15 : Activités ATPasiques basale et couplée des composés **27a** à **27c**. L'activité ATPasique est mesurée également pour **MBL-II-141** et le Ko143.

Tout comme pour le **MBL-II-141** et le Ko143, l'activité ATPasique basale est inhibée par le composé **27c**. Ces résultats tendent une nouvelle fois à confirmer l'importance de la présence d'un cycle indolique pour obtenir une activité inhibitrice. En effet, cette dernière est altérée pour les composés **27a** et **27b** où l'indole n'est pas présent.

Concernant l'activité ATPasique couplée, le composé **27c**, le plus actif en termes d'inhibition de l'efflux de la mitoxantrone *via* ABCG2 est également le plus actif en termes d'inhibition de l'activité ATPasique couplée. Cependant, bien que le composé **27a** soit capable d'inhiber correctement l'activité ATPasique couplée, il est 10 fois moins actif que le **MBL-II-141** en termes d'inhibition de transport.

II.4.7. RSA issues de la pharmacomodulation 6 : suppression de l'amide central

Afin de déterminer le rôle joué par la fonction amide présente dans la chaîne centrale sur l'activité biologique, nous avons décidé de la remplacer par une fonction amine tertiaire. Deux composés ont été synthétisés, l'un sous forme de chlorhydrate sans substitution du cycle

CHAPITRE 2. MODULATION DE LA PROTÉINE ABCG2

indolique (composé **32a**) et le second sous forme de base libre possédant un groupement méthoxylé en position 5 du cycle indolique (composé **31b**) (**Figure 55**).

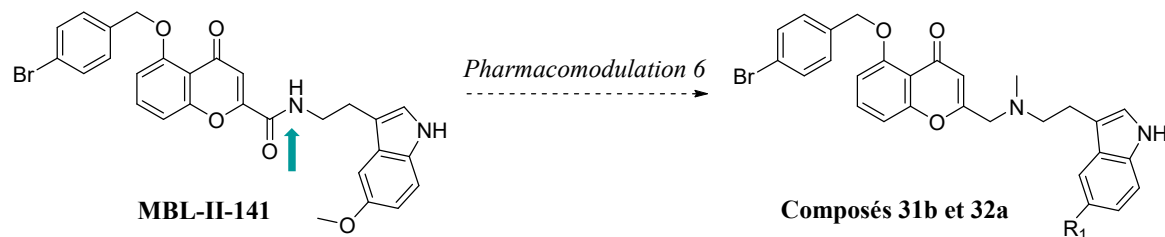


Figure 55: Analogues présentant une amine tertiaire au sein de la chaîne centrale

Les résultats biologiques obtenus pour l'inhibition de l'efflux de la mitoxantrone ainsi que pour l'étude de la cytotoxicité sont rassemblés dans le **Tableau 16**.

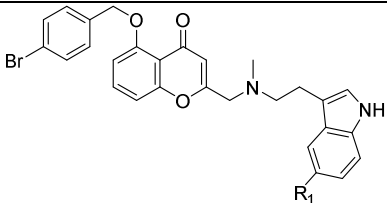
<div></div>							
Référence	R ₁	Forme	Cellules transfectées		Cellules sélectionnées		Cytotoxicité IG ₅₀ (μM)
			HEK293		H460		
			Inhibition		Inhibition		
			maximale %	EC ₅₀ (μM)	maximale %	EC ₅₀ (μM)	
MBL-II-141	/	/	98 ± 5	0,13 ± 0,09	107 ± 11	0,05 ± 0,01	>100
31b	OCH ₃	Base libre	75 ± 8	1,1 ± 0,6	106 ± 13	0,6 ± 0,2	>100
32a	H	Chlorhydrate	46 ± 10	1,8 ± 0,5	104 ± 12	1,1 ± 0,2	>100

Tableau 16 : Inhibition de l'efflux de la mitoxantrone sur les cellules transfectées surexprimant ABCG2 (HEK293-ABCG2) et sur les cellules H460MX sélectionnées et étude de la cytotoxicité des composés **31b** et **32a**. Les valeurs représentent la moyenne ± la déviation standard sur un minimum de trois expériences indépendantes.

L'introduction d'une charge positive au niveau de l'amine tertiaire du composé **32a** induit un effet négatif sur l'activité inhibitrice. En effet, le pourcentage d'inhibition observé n'atteint que 46% et la valeur d'EC₅₀ est environ 14 fois supérieure à celle du **MBL-II-141** sur les cellules transfectées HEK293-ABCG2. En parallèle, le composé **31b**, amine tertiaire sous

forme de base libre, présente un pourcentage d'inhibition plus élevé, certainement dû à la présence du groupement méthoxy sur le cycle indolique, mais son EC_{50} reste environ 9 fois supérieure au **MBL-II-141**. Ces résultats tendent à montrer que la suppression de la fonction amide au sein de la chaîne centrale est défavorable à l'inhibition pour les cellules transfectées et sélectionnées. De plus, les composés **31b** et **32a** ne sont pas cytotoxiques. Ainsi, une fois encore, ces composés présentent l'unique avantage d'introduire un azote basique permettant de former des sels pour jouer sur l'hydrosolubilité des produits synthétisés.

Ils ont par la suite été évalués pour leurs activités ATPasiques basale et couplée. Les résultats sont rassemblés dans le **Tableau 17**.

Référence	% Activité ATPasique basale	Inhibition activité ATPasique couplée EC_{50} (μ M)
MBL-II-141	62 ± 17	0,38
Ko143	26 ± 32	0,17
31b	30 ± 21	0,82
32a	34 ± 19	> 2

Tableau 17 : Activités ATPasiques basale et couplée des composés **31b** et **32a**. L'activité ATPasique est mesurée également pour **MBL-II-141** et Ko143.

Les composés **31b** et **32a** sont capables, tout comme le **MBL-II-141** et le Ko143, d'inhiber l'activité ATPasique basale. Cependant, ces deux composés sont moins efficaces en termes d'inhibition de l'activité ATPasique couplée, confirmant l'effet défavorable de la suppression de l'amide. Ces résultats corréleront une nouvelle fois avec le profil d'inhibiteur d'ABCG2.

II.4.8. RSA issues de la pharmacomodulation 7 : introduction d'un motif acide aminé

Le composé Ko143, inhibiteur de référence d'ABCG2, contient un motif leucine au sein de sa structure (**Figure 56**).

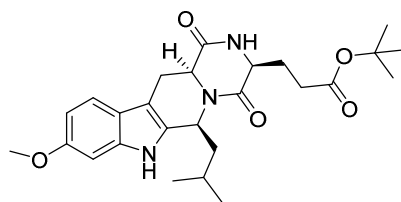


Figure 56 : Structure du Ko143.

À titre exploratoire, nous nous sommes intéressés à une septième pharmacomodulation qui consiste en l'introduction d'un motif acide aminé dans la partie centrale de nos composés. Trois acides aminés commerciaux, protégés sous leur forme d'ester de méthyle et de configuration L ont été utilisés : la L-valine, la L-leucine et la L-isoleucine (**Figure 57**).

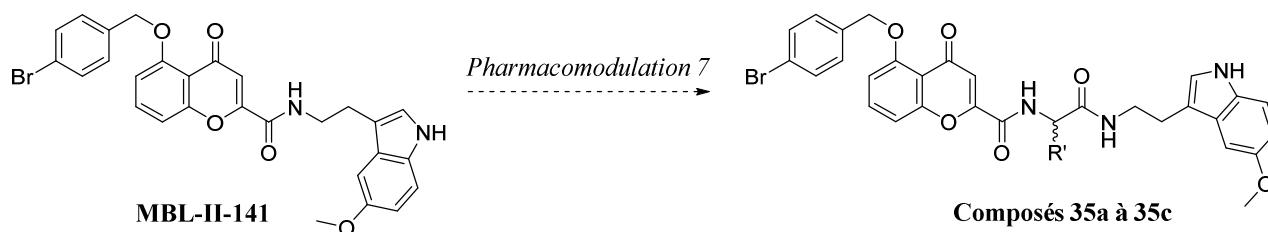


Figure 57 : Introduction d'un motif acide aminé dans la chaîne centrale.

Les intermédiaires sous la forme d'esters et d'acides ont également été testés biologiquement. Les résultats correspondant à l'inhibition de l'efflux de la mitoxantrone obtenus pour l'ensemble de ces composés sont rassemblés dans le **Tableau 18**.

CHAPITRE 2. MODULATION DE LA PROTÉINE ABCG2

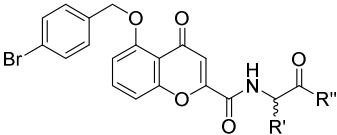
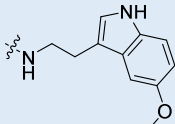
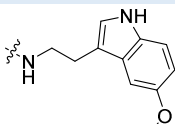
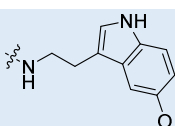
					
Référence	R'	R''	Cellules transfectées HEK293		Cytotoxicité IG ₅₀ (μM)
			Inhibition maximale %	EC ₅₀ (μM)	
MBL-II-141	/	/	98 ± 5	0,13 ± 0,09	>100
33a	CH(CH ₃) ₂	OCH ₃	102 ± 4	0,274 ± 0,009	17,3 ± 0,9
33b	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	OCH ₃	101 ± 7	0,6 ± 0,1	29,8 ± 0,9
33c	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	OCH ₃	115 ± 14	0,59 ± 0,08	22,6 ± 0,8
33d	CH(CH ₃) ₂	OC(CH ₃) ₃	97 ± 8	0,29 ± 0,01	6,6 ± 0,3
34a	CH(CH ₃) ₂	OH	17 ± 4	>10	>100
34b	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	OH	15 ± 1	>10	6,5 ± 0,5
34c	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	OH	24,5 ± 0,9	>10	>100
35a	CH(CH ₃) ₂		99 ± 3	0,34 ± 0,02	7,6 ± 0,6
35b	CH ₂ CH(CH ₃) ₂		105 ± 9	0,91 ± 0,06	>100
35c	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃		110 ± 5	0,16 ± 0,04	5,4 ± 0,6

Tableau 18 : Inhibition de l'efflux de la mitoxantrone sur les cellules transfectées surexprimant ABCG2 (HEK293-ABCG2) et étude de la cytotoxicité des composés **33a** à **35c**. Les valeurs représentent la moyenne ± la déviation standard sur un minimum de trois expériences indépendantes.

L'ensemble des esters intermédiaires **33a**, **33b**, **33c** et **33d** sont globalement moins actifs en termes d'inhibition que le chef de file. Les composés **33a** et **33d**, synthétisés à partir de la valine, présentent une diminution de l'activité inhibitrice d'un facteur 2 et 2,2 tandis que les composés **33b** et **33c**, synthétisés à partir de la leucine et de l'isoleucine augmentent les activités inhibitrices respectivement d'un facteur 5,3 et 4,5.

Les analogues acides **34a** à **34c** ne sont quant à eux pas actifs. L'hydrophilie de la fonction acide au sein de ces composés pourrait expliquer cette inactivité.

Pour finir, alors que le composé **35b** issu de la leucine présente une activité inhibitrice 7 fois inférieure au **MBL-II-141**, le composé **35a** issu du motif valine présente une diminution d'un facteur 2,6 de l'activité inhibitrice. Le composé **35c** quant à lui, issu du motif isoleucine, présente une activité équivalente au chef de file.

Concernant leur cytotoxicité, les composés esters intermédiaires **33a**, **33b** et **33c** sont plus toxiques que le **MBL-II-141** avec une toxicité accrue observée pour le composé **33d**, unique ester de *tertio*-butyle. Les dérivés acides **34a** et **34c**, bien que totalement inactifs, sont non toxiques avec des valeurs d'IG₅₀ supérieures à 100 µM. L'acide **34b** quant à lui présente un comportement différent, avec une forte cytotoxicité. Pour finir, la cytotoxicité des produits finaux **35a** et **35c** se révèle être largement supérieure au **MBL-II-141** tandis que le composé **35b** ne présente aucune cytotoxicité.

Les études de sélectivité et des activités ATPasiques basale et couplée relative à cette nouvelle famille sont actuellement en cours. D'après ces premiers résultats, nous pouvons tout de même conclure que ces composés, bien que moins actifs et plus toxiques que le **MBL-II-141**, restent tout de même intéressants à étudier et la modulation de la nature de l'acide aminé nous permettra de varier différentes propriétés physiques telles que la solubilité.

De plus, malgré l'absence du cycle indolique, les composés intermédiaires **33a** à **33c** présentent de bons résultats biologiques préliminaires. Ceci tend à montrer que l'absence de cycle indolique, important pour l'activité d'inhibition du transport, est contrebalancée par la présence de résidus hydrophobes sur la chaîne centrale. L'ajout de cycle indolique sur cette nouvelle série n'apparaît ainsi plus comme un paramètre si important. Ceci ouvre des perspectives à la synthèse d'autres amides (ne possédant pas forcément un cycle indolique), plus stables que les esters vis-à-vis d'une hydrolyse en milieu biologique, les acides correspondants étant inactifs (composés **34a** à **34c**).

II.5. CONCLUSIONS DES ÉTUDES DE RELATIONS STRUCTURE-ACTIVITÉ

La **Figure 58** dresse un bilan récapitulatif de l'impact de l'ensemble des modulations sur l'inhibition de l'activité de transport d'ABCG2 et sur les activités ATPasiques basale et couplée.

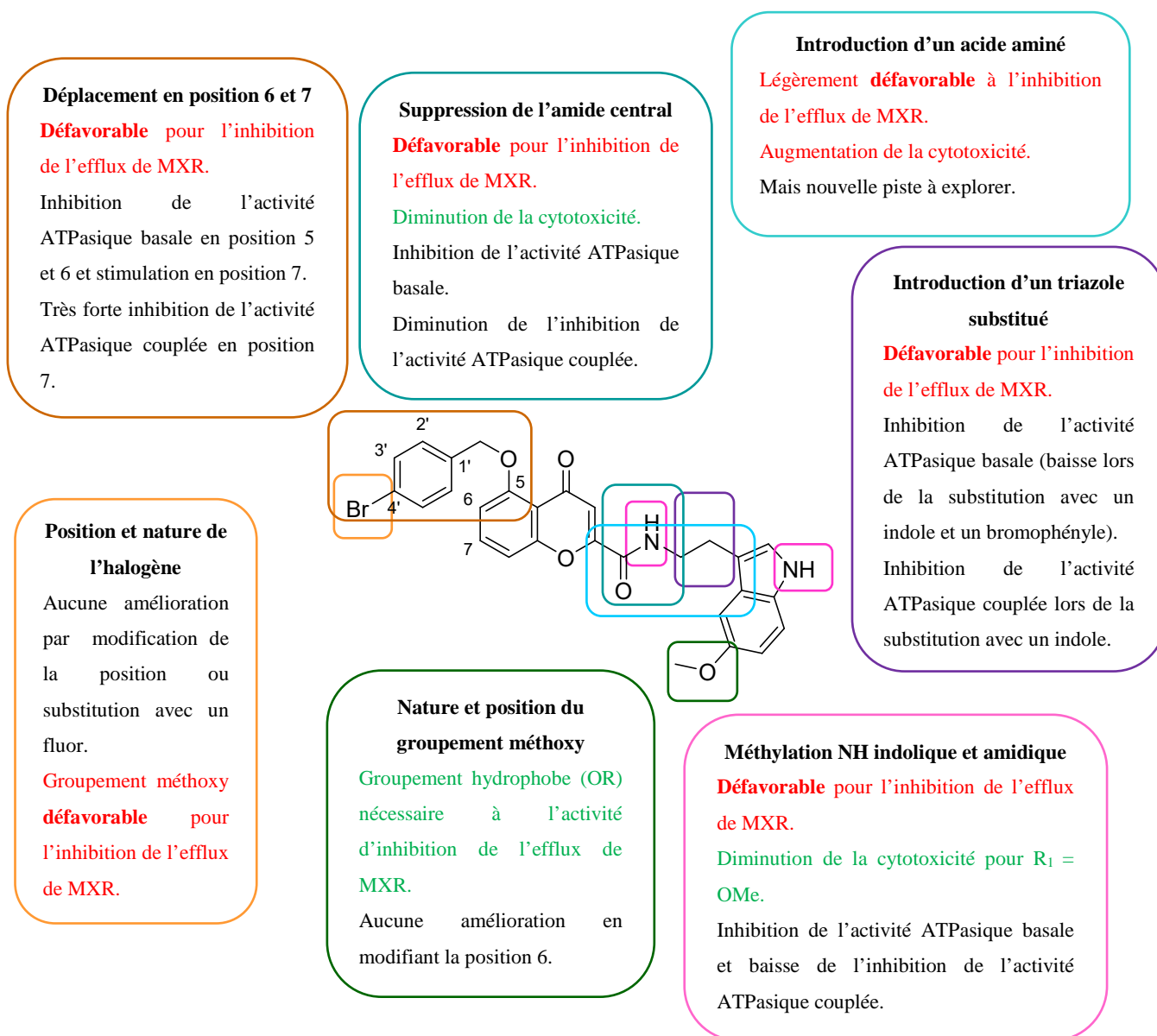


Figure 58 : Schéma résumant les points importants issus de l'étude des relations de structure-activité par rapport à l'inhibition de l'efflux de substrats et les activités ATPasiques (MXR = mitoxantrone).

Nous constatons que l'ensemble des composés synthétisés et testés agissent comme des inhibiteurs d'ABCG2. Cependant, aucun des composés ne parvient à surpasser l'activité

inhibitrice du **MBL-II-141**, malgré la diversité structurale des modulations apportées. Nous retiendrons tout de même le composé **11a** d'activité équivalente au chef de file et dépourvu de toute cytotoxicité. Ceci apporte ainsi de nouveaux éléments quant à la polyspécificité de la protéine.

L'étude des activités ATPasiques basale et couplée nous apportent de nouvelles informations quant à l'interaction de nos composés avec la protéine ABCG2. En effet, ces activités ATPasiques semblent obéir à différents mécanismes et/ou induire différentes conformations de la protéine. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, ces deux activités peuvent être modulées séparément par différentes modifications structurales des chromones synthétisées. Par exemple, alors que le **MBL-II-141** ainsi que l'ensemble des autres composés inhibent l'activité ATPasique basale, le composé **7b** est le seul capable de la stimuler.

La corrélation existante entre l'inhibition de l'activité de transport d'ABCG2 et l'inhibition de l'activité ATPasique couplée suggère un couplage entre l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP et la translocation des substrats au sein du domaine transmembranaire. Cependant, peu d'informations existent sur le rôle joué par l'activité ATPasique basale. Il est possible que cette activité soit impliquée dans la flexibilité de la protéine, contribuant ainsi à la polyspécificité d'ABCG2 vis-à-vis d'une large variété de substrats.

II.6. PERSPECTIVES

Dans la continuité de la pharmacomodulation 7, de nouveaux acides aminés seront introduits, nous permettant ainsi de moduler certaines propriétés physiques telles que la solubilité. Dans chaque cas, l'intermédiaire ester de méthyle ainsi que les dérivés couplés à la 5-méthoxytryptamine seront testés. Nous pouvons aussi envisager d'autres amides puisque sur cette série, la présence du cycle indolique n'apparaît plus être si importante. De plus, suite aux résultats obtenus par le composé **11a**, il sera intéressant de synthétiser cette nouvelle série avec un atome de brome en position 2' du cycle benzyloxy.

Les études du **MBL-II-141** vont également se poursuivre. Tout d'abord *in vivo* où un nouveau modèle animal sera mis en place afin de tester le chef de file sur des souris xénogreffées par des cellules, non plus transfectées mais sélectionnées, surexprimant ABCG2. Ce nouveau modèle animal, plus proche des cas cliniques, nous permettra de confirmer ou non l'efficacité

du **MBL-II-141**. Ces tests seront réalisés au sein de l'équipe du Dr. Gottesman et du Dr. Ambudkar au *National Cancer Institute* (NCI) à Bethesda (États-Unis). La sélectivité du **MBL-II-141** pour ABCG2, vis-à-vis de la P-gp sera également étudiée *in vivo*.

Le **MBL-II-141**, parmi d'autres inhibiteurs, sera également utilisé dans la co-cristallisation de la protéine ABCG2 afin d'en établir sa structure cristalline 3D haute résolution. Ces études seront réalisées au sein de l'équipe du Dr. Pierre Falson de l'IBCP de Lyon.

Des études pharmacocinétiques (métabolisation, biodisponibilité, ...) du **MBL-II-141** sont également actuellement en cours au sein de l'équipe du Pr. Jérôme Guitton de l'Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lyon.

L'une des contraintes rencontrée avec le **MBL-II-141** étant son hydrosolubilité, la présence de groupements salifiables, tels que des azotes, peut s'avérer bénéfique malgré une perte d'activité *in vitro*. Ainsi, il sera intéressant de tester *in vivo* de nouveaux composés salifiables, moins actifs que le chef de file mais sous forme de sel afin d'en étudier leur profil pharmacologique.

Cependant, comme nous avons pu le constater, malgré un grand nombre de pharmacomodulations réalisées, nous arrivons à un stade où il devient difficile d'obtenir de meilleurs composés que le **MBL-II-141**. Il devient ainsi nécessaire de changer notre approche. Comme nous l'avons vu précédemment, les activités ATPasiques basale et couplée semblent obéir à différents mécanismes. Bien que le composé **7b** soit l'unique dans cette série capable de stimuler cette activité, d'autres inhibiteurs actifs d'ABCG2 se sont révélés être également des stimulateurs de l'activité ATPasique basale. Parmi eux des dérivés hydroxy-indénoindoles. Ceci atteste ainsi de la polyspécificité d'ABCG2 et de l'existence de plusieurs sites d'interaction. Comme nous le verrons dans la suite de ce chapitre, ces deux sites d'interaction semblent être proches l'un de l'autre. C'est pour cette raison que l'une des perspectives de ce projet consiste en la synthèse de nouveaux composés constitués d'une part du **MBL-II-141**, inhibiteur de l'activité ATPasique basale et, d'autre part, d'un motif hydroxy-indénoindole, stimulateur de l'activité ATPasique basale, les deux unités étant reliées par différents bras espaceurs (**Figure 59**). Ces nouveaux composés pourront permettre ainsi d'atteindre simultanément deux sites d'interaction et d'augmenter considérablement l'activité inhibitrice de l'efflux *via* ABCG2.

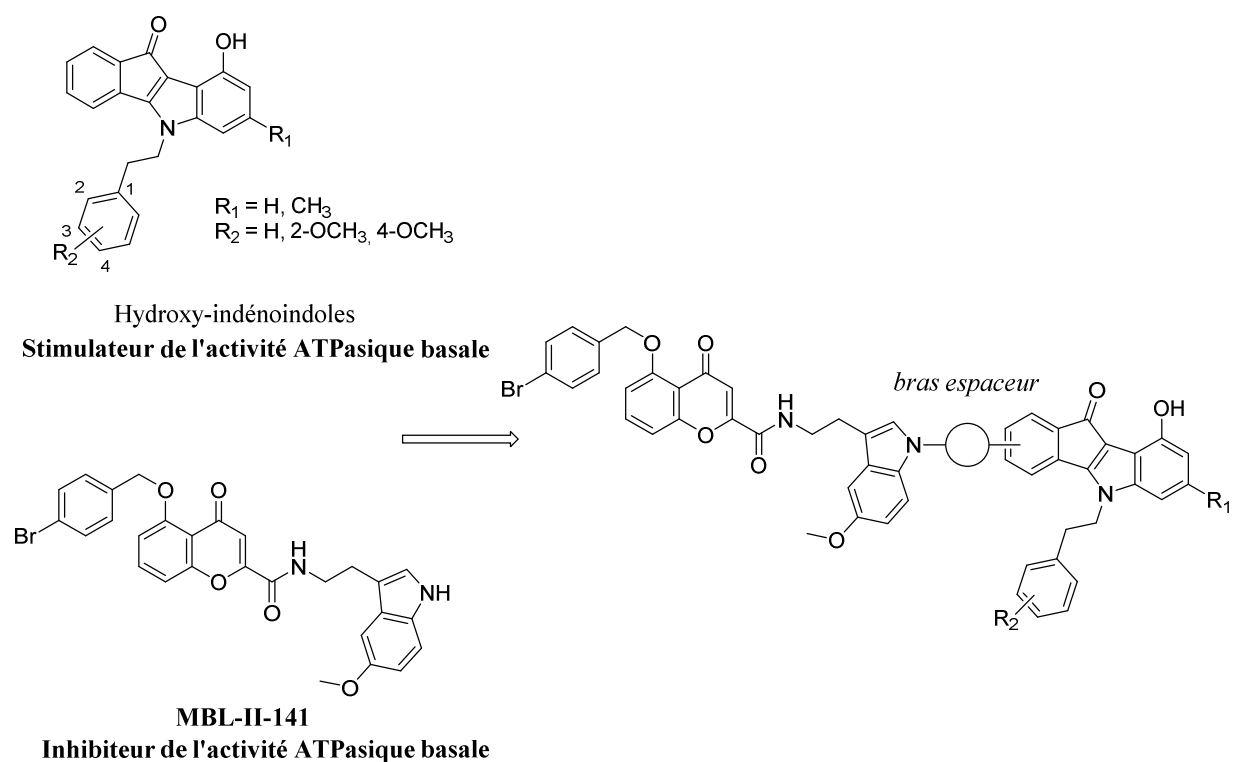


Figure 59 : Nouvelles séries de composés issus de dérivés hydroxy-indénoindoles et du **MBL-II-141**.

Nous nous intéresserons dans la suite de ce chapitre de plus près à ces différents sites d'interaction. En effet, nous avons entrepris des études de modélisation moléculaire, en particulier de construction de modèles pharmacophores dans le but, d'une part, de déterminer les différences structurales existantes entre ces deux sites d'interaction et d'autre part, de créer deux modèles nous permettant de cribler une large base de données et de découvrir de nouvelles structures potentiellement actives.

III. Élucidation des propriétés des sites d'interaction de la protéine ABCG2 à l'aide de pharmacophores

La structure cristalline d'ABCG2 n'ayant pas été découverte, le criblage de nombreux inhibiteurs sélectifs et non toxiques d'ABCG2, tels que les chromones présentées précédemment, a permis de détecter différents comportements de ces inhibiteurs vis-à-vis de la protéine et d'émettre ainsi de nouvelles hypothèses quant aux mécanismes d'action mis en jeu.

III.1. LES DIFFÉRENTS TYPES D'INHIBITEURS D'ABCG2

III.1.1. Mise en évidence de plusieurs sites d'interaction avec ABCG2

En criblant une large gamme d'inhibiteurs structuralement différents, nos collaborateurs biologistes ont récemment découvert des comportements différents des inhibiteurs actifs d'ABCG2 vis-à-vis de l'activité ATPasique basale, suggérant la présence de différents sites d'interaction avec la protéine.

Comme nous l'avons mis en évidence précédemment, différentes particularités sur le type d'inhibition des dérivés du **MBL-II-141** ont pu être mises en évidence.²⁵⁴ Les inhibiteurs synthétisés les plus actifs sont en effet capables d'induire une inhibition plus ou moins importante de l'activité ATPasique basale de la protéine, à l'image du **MBL-II-141**. A l'inverse, le composé **7b** permet quant à lui de stimuler cette activité basale, tout en inhibant l'activité ATPasique couplée, suggérant ainsi que ce composé est transporté par la protéine (transport non démontré à l'heure actuelle).

Tout comme pour les chromones, une récente étude de l'équipe du Dr. Di Pietro a mis en évidence le comportement différent vis-à-vis de l'activité ATPasique basale de bis-chalcones symétriques identifiées comme nouveaux inhibiteurs actifs, sélectifs et non toxiques de la

protéine ABCG2.²³⁵ En effet, contrairement au Ko143 et au **MBL-II-141**, inhibiteurs de l'activité ATPasique basale, deux nouveaux composés, les bis-chalcones **16s** (3-(2,6-diméthoxyphényl)-1-(4-[3-(2,6-diméthoxyphényl)-acryloyl]-phényl)-propénone) et **26s** (3,5-diméthoxyphényl)-1-(4-[3-(3,5-diméthoxyphényl)-acryloyl]-phényl)-propénone), présentant les meilleurs résultats biologiques *in vitro*, se sont révélées stimuler cette activité, 1,6 et 1,8 fois respectivement, tout comme la quercétine, substrat transporté par ABCG2, qui multiplie par 3,6 la stimulation de l'activité ATPasique basale (**Figure 60**).

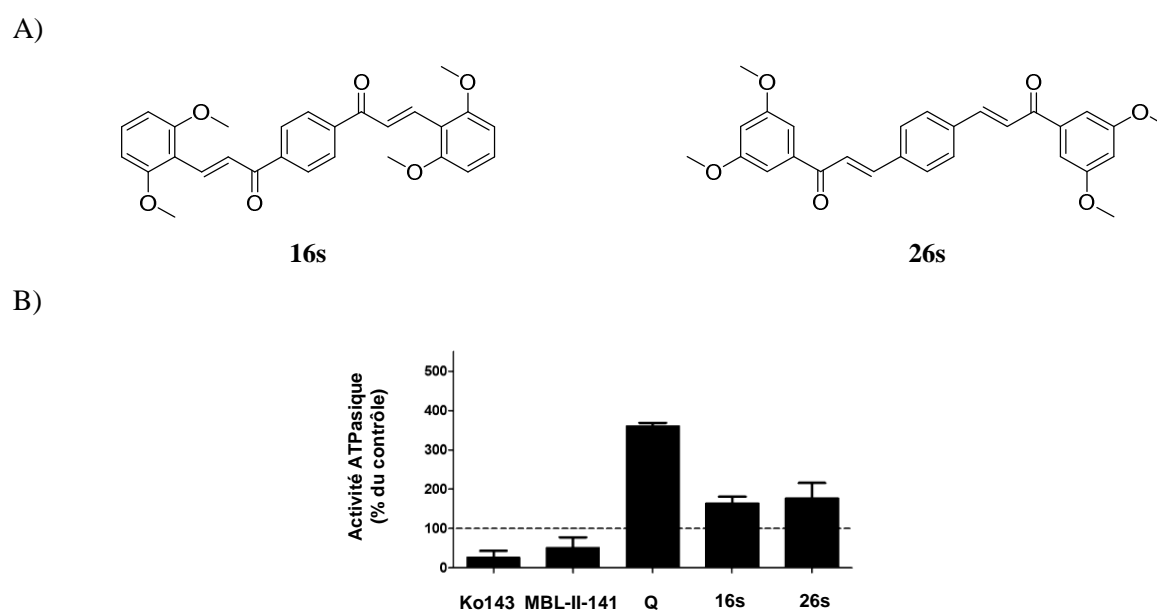


Figure 60 : A) Structures des bis-chalcones **16s** et **26s**. B) Effet des composés **16s** et **26s**, de la quercétine (Q), du Ko143 et du **MBL-II-141** sur l'activité ATPasique basale d'ABCG2. Résultats issus des travaux de Winter.²⁵⁵

L'activité ATPasique couplée, observée en présence de 2 μM de quercétine, s'est révélée être dépendante de la concentration en **16s**, une inhibition complète étant produite avec une valeur d' EC_{50} équivalente à 0,19 μM . Pour **26s**, une inhibition plus faible a été observée ($\text{EC}_{50} = 0,27 \mu\text{M}$) avec une inhibition maximale limitée à 72%.

La stimulation de l'activité ATPasique basale produite par **16s** suggère un site d'interaction différent des autres composés agissant comme inhibiteurs de cette même activité, tels que Ko143 ou **MBL-II-141**. Afin d'étudier cette hypothèse, l'inhibition de l'efflux de mitoxantrone *via* ABCG2 induite par **16s** a été déterminée en présence de faibles concentrations de **MBL-II-141** ou Ko143 (respectivement 0,1 et 0,02 μM , produisant environ 50% d'inhibition). De manière intéressante, un effet synergique a été observé dans les deux

cas étudiés, l'effet le plus important ayant été obtenu avec le **MBL-II-141**. En effet, **MBL-II-141** est capable d'augmenter d'un facteur 15 l'activité inhibitrice de **16s** (contre 1,8 fois pour Ko143). De la même manière, une faible concentration de **16s** (0,1 μ M) permet d'augmenter d'un facteur 3 l'activité inhibitrice du **MBL-II-141** et d'un facteur 2,4 celle de Ko143 (Tableau 19).

Inhibiteur étudié	Inhibiteur ajouté	EC ₅₀ (μ M)
16s	/	0,23 \pm 0,04
	+ MBL-II-141 (0,1 μ M)	0,02 \pm 0,01
	+ Ko143 (0,02 μ M)	0,13 \pm 0,03
MBL-II-141	/	0,094 \pm 0,001
	+ 16s (0,1 μ M)	0,03 \pm 0,02
Ko143	/	0,029 \pm 0,008
	+ 16s (0,1 μ M)	0,012 \pm 0,007

Tableau 19 : Étude de l'effet de **16s**, Ko143, **MBL-II-141** et de leurs combinaisons sur l'inhibition de l'efflux de mitoxantrone *via* ABCG2. Chaque valeur correspond à la moyenne \pm la déviation standard sur un minimum de trois expériences.

Ces résultats suggèrent ainsi que les deux types d'inhibiteurs étudiés (stimulateur et inhibiteur de l'activité ATPasique basale) se lient très probablement à différents sites d'ABCG2. Le synergisme observé pour l'activité de **16s** en présence d'une faible concentration de **MBL-II-141** suggère également la proximité de ces deux sites d'interaction.

III.1.2. L'hypothèse de quatre sites d'interaction avec ABCG2

Les criblages biologiques, regroupant plusieurs familles de molécules, ont permis d'élaborer une hypothèse sur l'existence d'au moins quatre classes d'inhibiteurs d'ABCG2, pouvant se loger dans quatre sites de la protéine, certains sites pouvant se chevaucher partiellement (Figure 61).

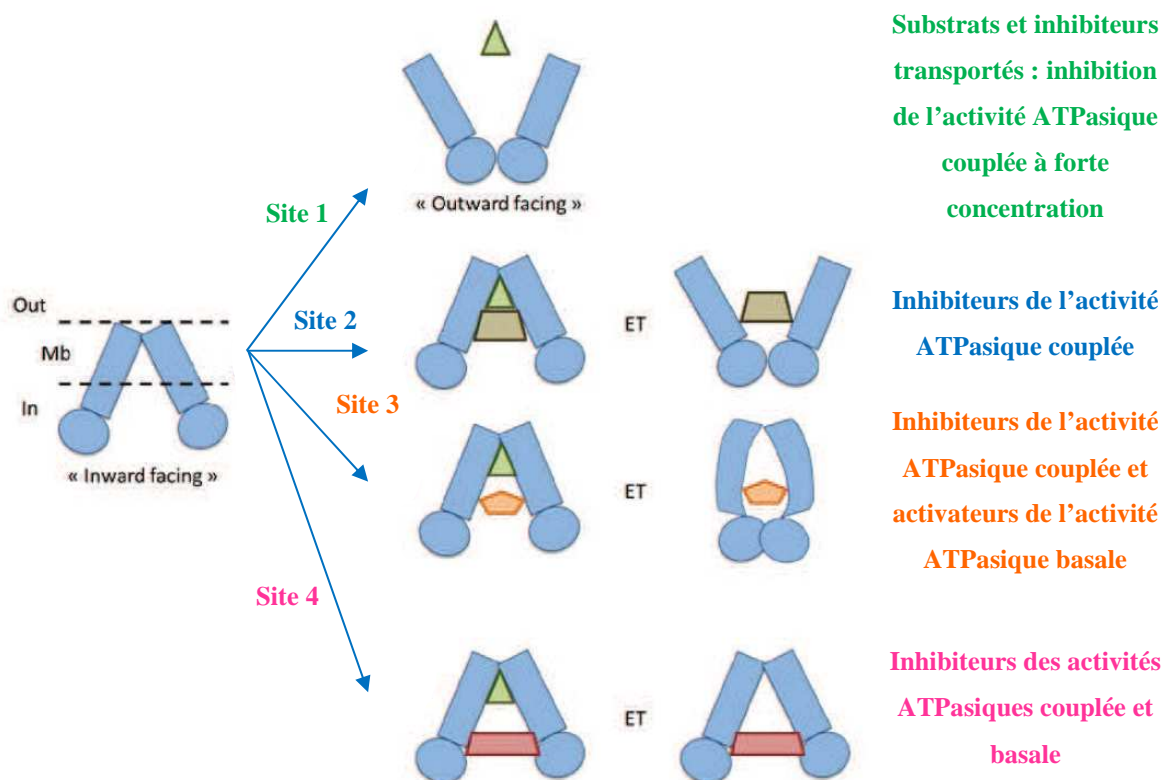


Figure 61 : Schéma représentant les quatre sites d'interaction hypothétiques de la protéine ABCG2.

Le **site 1** rassemble les substrats et inhibiteurs transportés par ABCG2, capables d'inhiber l'activité ATPasique couplée à forte concentration et d'activer l'activité ATPasique basale. Il semblerait que ces inhibiteurs miment le substrat empêchant ainsi ce dernier d'être transporté. Parmi ces composés on peut citer le nilotinib, l'imatinib ou encore la prazosine, substrats connus d'ABCG2.

Le **site 2** regroupe les inhibiteurs non transportés induisant une inhibition de l'activité ATPasique couplée et peu d'effet sur l'activité ATPasique basale. Parmi ces composés se trouvent les chromones **7a** et **27a** présentées précédemment.

Les inhibiteurs appartenant au **site 3** sont capables de stimuler l'activité ATPasique basale tout en n'étant pas transportés (aucune mise en évidence de transport). Une des hypothèses émises pour ce mécanisme de transport est la suivante : ces composés sont capables de mimer les substrats puis produisent un découplage. L'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP ne parvient pas à être transmise et le transport ne peut avoir lieu. Cependant l'hypothèse d'un transport en « cycle futile » n'est pas à écarter. En effet, l'inhibiteur est transporté une première fois *via* ABCG2. Cependant, en raison de son hydrophobicité, ce composé est immédiatement transporté à nouveau vers l'intérieur. Puis le cycle recommence, saturant ainsi

le système et empêchant le transport d'autres substrats. Bien que fortement plausible, cette dernière hypothèse reste difficile à prouver. La chromone **7b** et la bis-chalcone **16s** font parties de cette classe d'inhibiteurs.

Pour finir, le **site 4** regroupe les inhibiteurs non transportés d'ABCG2, inhibant les activités ATPasiques couplée et basale tels que le **MBL-II-141** ou le Ko143. Ces composés semblent bloquer la formation des dimères de NBDs empêchant ainsi l'hydrolyse de l'ATP et donc le transport.

Dans le cadre de ce travail, nous nous intéresserons uniquement aux **sites 3 et 4** d'interaction avec ABCG2.

III.1.3. La construction de modèles pharmacophores afin de différencier les sites 3 et 4

D'après les observations réalisées par nos collaborateurs biologistes, nos efforts se sont concentrés sur l'élucidation des propriétés chimiques des hypothétiques sites d'interaction 3 et 4 de la protéine ABCG2. Ces deux sites n'ont encore jamais été caractérisés dans la littérature. En observant les structures des composés, de faibles modifications structurales suffisent pour que certains composés atteignent un site d'interaction plutôt qu'un autre. Par exemple, d'après les travaux du Dr. Di Pietro, l'hydroxy-indénoindole **142s**, présentant une fonction phénol, interagit avec le site 3 alors que l'indénoindole **18i**, présentant un motif benzoquinone, interagit avec le site 4 (**Figure 62**).²⁵⁶

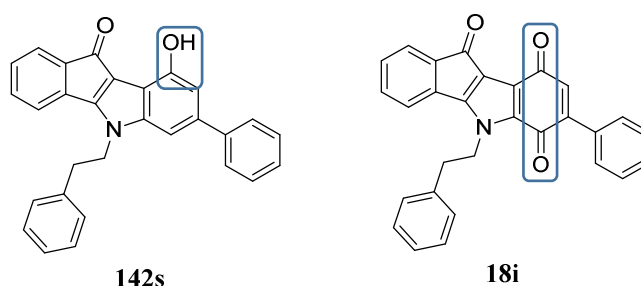


Figure 62 : Structures du composé **142s**, stimulateur de l'activité ATPasique basale interagissant avec le site 3 et du composé **18i**, inhibiteur de l'activité ATPasique basale, interagissant avec le site 4.²⁵⁶

Ne connaissant pas la structure 3D de la protéine ABCG2 mais possédant une large base de données de composés appartenant à chacun des deux sites d'interaction, un travail de

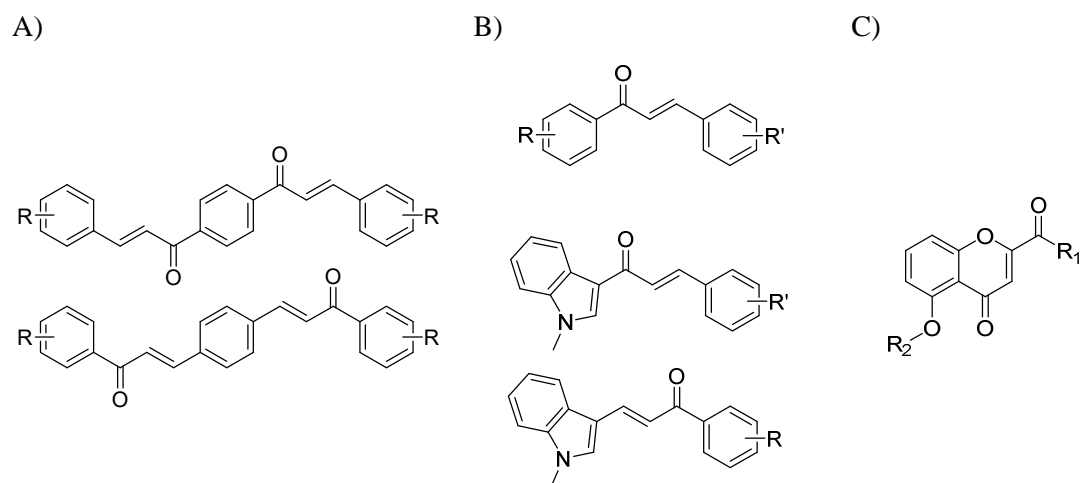
modélisation moléculaire a été entrepris afin de générer deux modèles pharmacophores permettant de comprendre les informations structurales et interactionnelles caractérisant chacun des deux sites. Ceci nous permettra également d'obtenir de nouvelles informations quant aux relations structure-activité et de nouvelles orientations pour les futures synthèses.

III.2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

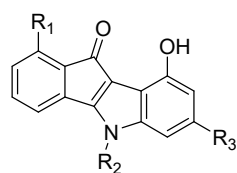
III.2.1. La base de données

Afin de réaliser ce travail de modélisation moléculaire, une base de données de composés nous a été fournie par nos collaborateurs biologistes de l'IBCP de Lyon. Cette base de données est constituée de 162 composés capables de stimuler l'activité ATPasique basale (Site 3) et de 25 composés capables d'inhiber l'activité ATPasique basale (Site 4).

Les composés interagissant avec le site 3 sont des bis-chalcones symétriques,²³⁵ des chalcones,^{230, 257} des chromones,²³⁸ des hydroxyindénoindoles²⁵⁶ et des chalcones possédant des groupements quinoxalines.²³⁴ Les structures des différentes familles de composés utilisés sont regroupées dans la **Figure 63**. Ces composés sont numérotés de **1s** à **157s**, la lettre « s » faisant référence à « Stimulateur » de l'activité ATPasique basale.



D)



E)

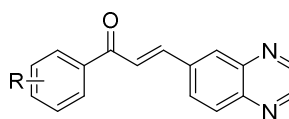
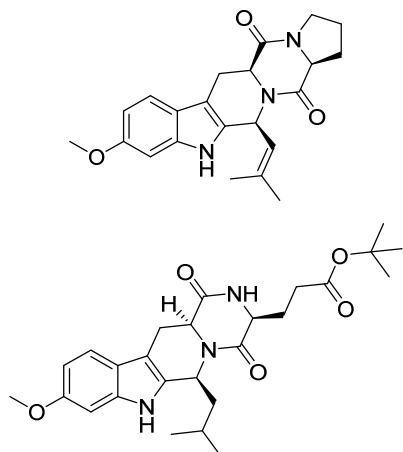


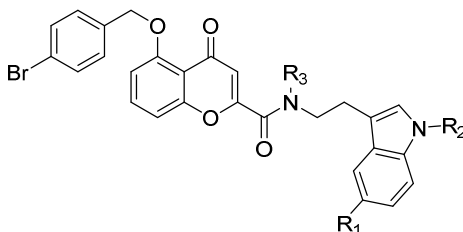
Figure 63 : Composés appartenant au site 3. A) bis-chalcones symétriques. B) Chalcones. C) Chromones. D) Hydroxyindénoindoles. E) Chalcones possédant des groupements quinoxalines.

Les composés interagissant avec le site 4 sont la Fumitremorgin C et le Ko143, des chromones dérivés du **MBL-II-141**,²⁵⁴ des indéno[1,2-*b*]indoles²⁵⁶ et des dérivés benzoquinones.²³¹ Les structures des différentes familles de composés utilisés sont regroupées dans la **Figure 64**. Ces composés sont numérotés de **1i** à **25i**, la lettre « **i** » faisant référence à « **Inhibiteur** » de l'activité ATPasique basale.

A)



B)



C)

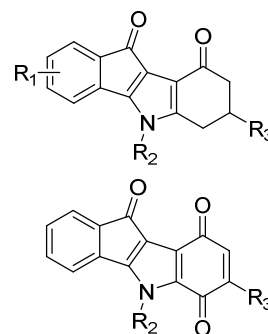


Figure 64 : Composés appartenant au site 4. A) Fumitremorgin C et Ko143. B) Chromones analogues du **MBL-II-141**. C) Indéno[1,2-*b*]indoles et dérivés benzoquinones.

Les structures de l'ensemble des composés sont regroupées en annexe I.

III.2.2. Les logiciels utilisés pour la détermination et l'analyse des pharmacophores

Afin de réaliser l'ensemble de ces travaux, deux logiciels de modélisation moléculaire, développés par Molecular Discovery, ont été utilisés : **VolSurf+** (Version 1.1.1)²⁵⁸⁻²⁶⁰ et **FLAP** (2.0.2).²⁶¹⁻²⁶³ Ces deux logiciels se basent sur les principes du logiciel **GRID**.²⁶⁴

III.2.2.1 Le programme GRID

GRID permet le calcul des énergies d'interaction entre une entité chimique (la sonde) et une autre molécule (la cible) et les décrit en termes de **champs d'interaction moléculaire** ou **MIFs** (*Molecular Interaction Fields*). Les champs d'interaction moléculaire peuvent être définis comme étant la distribution des interactions physiques potentielles qu'est capable de faire une molécule avec son environnement, incluant les interactions électrostatiques, les liaisons hydrogènes, les interactions hydrophobes et les interactions de Van der Waals.

Au sein du programme GRID, la molécule cible peut être une macromolécule, telle qu'une protéine, une petite molécule ou un composé médicament. Les interactions de la sonde avec la molécule cible sont calculées en certaines positions distribuées tout le long de la molécule cible et appelées « points GRID ». Les énergies sont représentées par des surfaces en 3 dimensions entourant la molécule cible et appelées champs d'interaction moléculaire (MIFs) (**Figure 65**). Différentes sondes issues de GRID peuvent être utilisées. En particulier, quatre d'entre elles sont employées dans le cadre de FLAP :

- **la sonde H** : elle définit la forme de la structure ;
- **la sonde DRY** : il s'agit de la sonde hydrophobe. Elle se place sur chaque atome situé à la surface de la molécule cible capable de réaliser des interactions favorables avec un environnement hydrophobe situé sur une autre molécule ;
- **la sonde N1** : il s'agit de l'atome d'azote d'un amide capable de donner une liaison hydrogène ;
- **la sonde O** : il s'agit de l'oxygène d'un groupement carbonyle, capable d'accepter une ou deux liaisons hydrogènes.

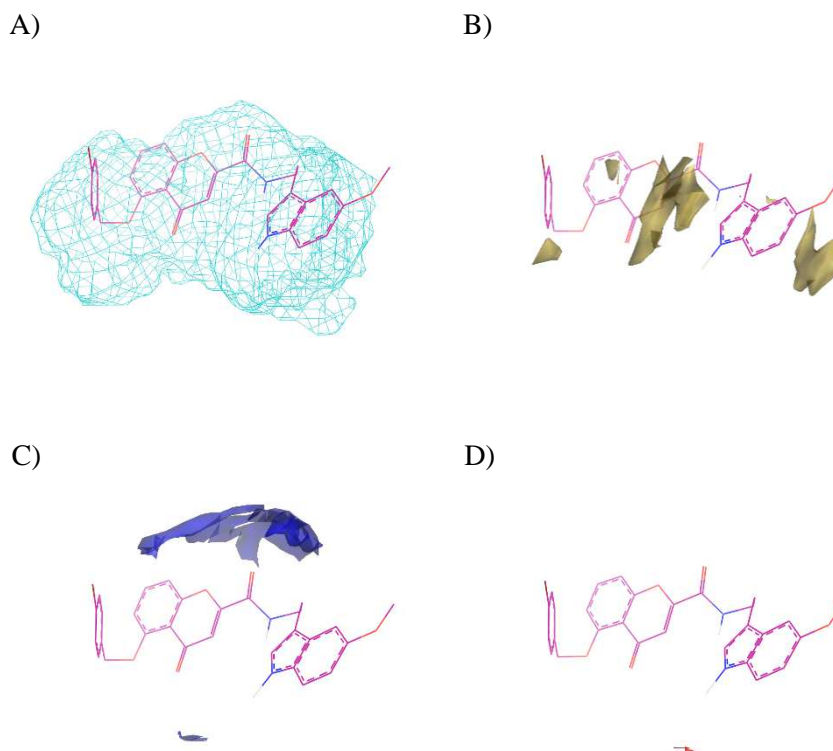


Figure 65 : Représentation des MIFs du **MBL-II-141**. A) MIF correspondant à la sonde H décrivant la forme. B) MIF correspondant à la sonde DRY décrivant les interactions hydrophobes. C) MIF correspondant à la sonde N1 décrivant les interactions hydrogènes donneurs. D) MIF correspondant à la sonde O décrivant les interactions hydrogènes accepteurs.

III.2.2.2 VolSurf+

VolSurf+ est un logiciel qui permet de convertir les informations contenues dans les champs d'interaction moléculaire GRID 3D de composés en 128 descripteurs, décrivant leurs propriétés physico-chimiques et pharmacocinétiques (**Figure 66**).²⁵⁸⁻²⁶⁰

Ces descripteurs réfèrent entre autre à :

- la taille et la forme moléculaire ;
- la description des régions hydrophiles et hydrophobes ;
- les moments amphiphiles, la balance hydrophile-lipophile ;
- la diffusivité moléculaire, la solubilité, la flexibilité moléculaire ;
- des modèles ADME (Absorption, Distribution, Métabolisme et Excrétion) ;

Tous les détails concernant ces 128 descripteurs sont regroupés en annexe II.

CHAPITRE 2. MODULATION DE LA PROTÉINE ABCG2

Afin d'extraire, de rationaliser et d'interpréter les informations obtenues par ces descripteurs, VolSurf+ met à disposition des outils statistiques, utilisés en chimiométrie, tels que l'analyse en composantes principales (PCA, *Principal Component Analysis*) ou la régression par les moindres carrés partiels (PLS, *Partial Least Squares*).

Ces outils statistiques permettent ainsi de convertir l'ensemble des informations obtenues à partir des descripteurs en cartes à 2 ou 3 dimensions, corrélant le comportement de chaque composé vis-à-vis de chaque descripteur avec leurs données expérimentales, telles que les activités biologiques (**Figure 66**).

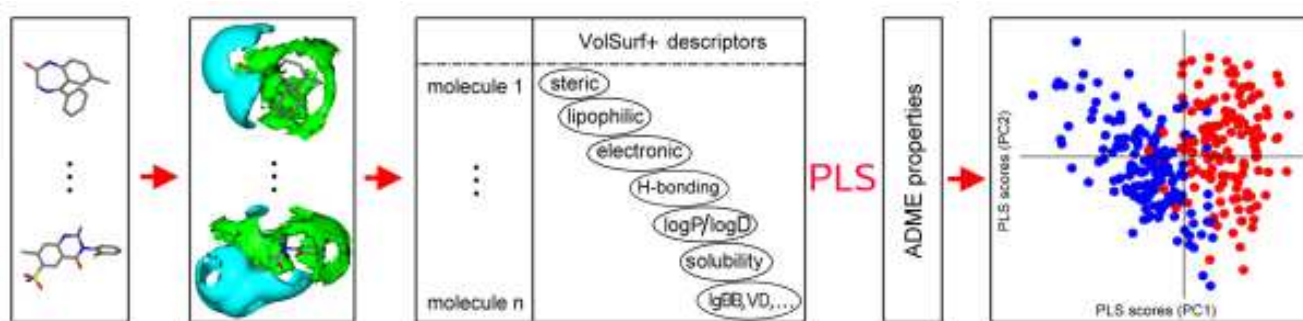


Figure 66: Étapes du fonctionnement du logiciel VolSurf+.

Prenons à titre d'exemple la carte 2D, illustrée dans la **Figure 66**. Elle représente la projection de différents composés dans un nouveau repère dont les axes concentrent la plus grande partie de la variabilité des composés selon les 128 descripteurs. Les composés rouges représentent les composés les moins actifs selon une certaine activité biologique et les composés bleus les plus actifs. Il est ainsi possible de distinguer une différence très nette de projection entre les composés actifs et inactifs et ainsi de déterminer quels descripteurs permettent de les discriminer au mieux. Ce logiciel a ainsi la capacité de réaliser un modèle statistique à partir de données expérimentales, de prédire le comportement de nouveaux composés au sein des modèles construits, de prédire l'influence de modifications structurales et d'optimiser les structures de composés existants afin qu'ils corrélerent au modèle souhaité. Ce logiciel est également capable de sélectionner, dans une base de données, des composés de structures et de comportements physicochimiques et pharmacocinétiques très différents afin de construire un modèle pharmacophore. Nous utiliserons cette dernière propriété dans le cadre de ce projet.

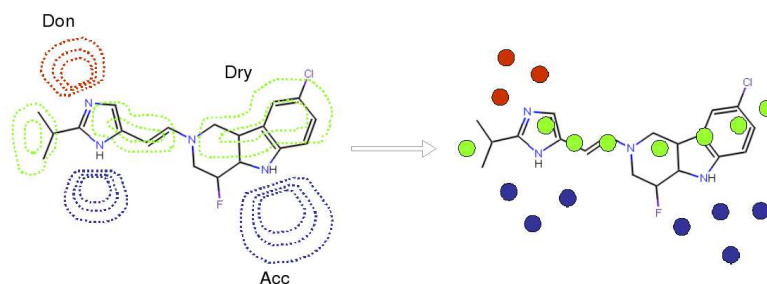
III.2.2.3 FLAP

○ Le principe de superposition de FLAP

FLAP (Fingerprints for Ligands And Proteins) est un logiciel de modélisation moléculaire qui permet la comparaison de molécules à partir « d'empreintes ». Ces empreintes dérivent des champs d'interaction moléculaire issus de GRID.²⁶¹⁻²⁶³ FLAP réduit dans un premier temps la complexité de ces champs en sélectionnant un certain nombre de points représentatifs des interactions correspondantes à chaque sonde (O, N1 et DRY, **Figure 67A**). Le nombre de points sélectionnés pour chaque sonde dépend du volume du champ d'interaction moléculaire et de son niveau d'énergie. Chacun de ces points est caractérisé par :

- le type d'interaction à ce point (hydrophobe, accepteur, donneur) ;
- la valeur de l'énergie (kcal/mol) ;
- les coordonnées cartésiennes qui définissent la position du point.

A)



B)

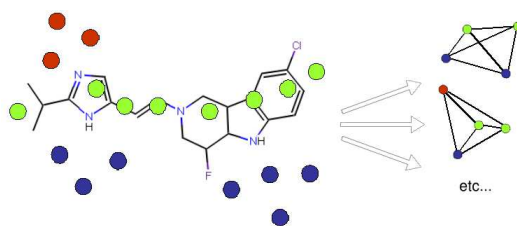


Figure 67 : A) Extraction des points à partir des champs d'interaction moléculaire. B) Formation des quadruplets.

Une fois ces points déterminés, FLAP crée toutes les combinaisons possibles entre quatre points formant des quadruplets (**Figure 67B**). Pour chaque quadruplet est calculée la distance euclidienne séparant chacun des quatre membres du quadruplet (six valeurs de distance au total). L'information issue du calcul de ces distances constitue le cadre de travail de FLAP.

Les quadruplets de chaque molécule sont ainsi stockés sous forme d'« empreintes pharmacophoriques ». Les molécules peuvent ainsi être comparées en superposant leurs « empreintes » et en calculant directement la similarité des champs d'interaction moléculaire.

Lors de l'étape de superposition, FLAP détermine, pour chaque sonde prise individuellement (H, O, N1, DRY) ou en association les unes aux autres (exemple : H*O*N1 correspond à la combinaison des sondes H, O et N1), le degré de superposition des champs d'interaction moléculaire entre chaque molécule superposée. Ce degré de superposition constitue le *probe score*. FLAP détermine également une somme globale (*Global-Sum*) correspondant à la somme de l'ensemble des *probe scores* obtenus pour chaque sonde prise individuellement et le produit global (*Glob-Prod*) correspondant au produit de l'ensemble des *probe scores* obtenus pour chaque sonde prise individuellement. Dès lors que l'ensemble de ces valeurs ont été déterminées, FLAP calcule la « *distance* », qui représente la similarité globale entre le ligand et les structures des composés.

○ Génération d'un pharmacophore

A partir de la superposition des différents champs d'interaction moléculaire de l'ensemble des molécules étudiées, FLAP détermine *les champs d'interaction pharmacophorique* ou *PIFs* (**Figure 68**), correspondant à la moyenne des champs d'interaction moléculaire de chaque composé en chaque point de la grille selon chaque sonde.

FLAP utilise également des *pseudo-champs d'interaction moléculaire* (*pseudo-MIFs*) représentant un champ de densité électronique, centré sur chaque atome et correspondant à un type de sonde choisi (O, N1 ou DRY). Une nouvelle cage GRID peut ainsi être utilisée de sorte que l'on obtienne un emboîtement maximal entre un champ d'interaction moléculaire donné et le pseudo-champ correspondant à la sonde équivalente (**Figure 68**). Ainsi, tout comme pour les MIFs, la moyenne des pseudo-champs représente le *pseudo-champ d'interaction moléculaire* (*pseudo-PIFs*) caractérisant les interactions communes en chacune des positions atomiques. Le centroïde de chacune de ces positions atomiques communes est appelé *point pharmacophorique*.

Ainsi, grâce à cette approche, à partir d'atomes individuels, de MIFs et de pseudo-MIFs, un set de molécules alignées est converti en une *pseudo-molécule pharmacophorique*, appelée *pharmacophore*, constituée de points pharmacophoriques, de champs d'interaction pharmacophorique et de pseudo-champs d'interaction pharmacophorique (**Figure 68**).

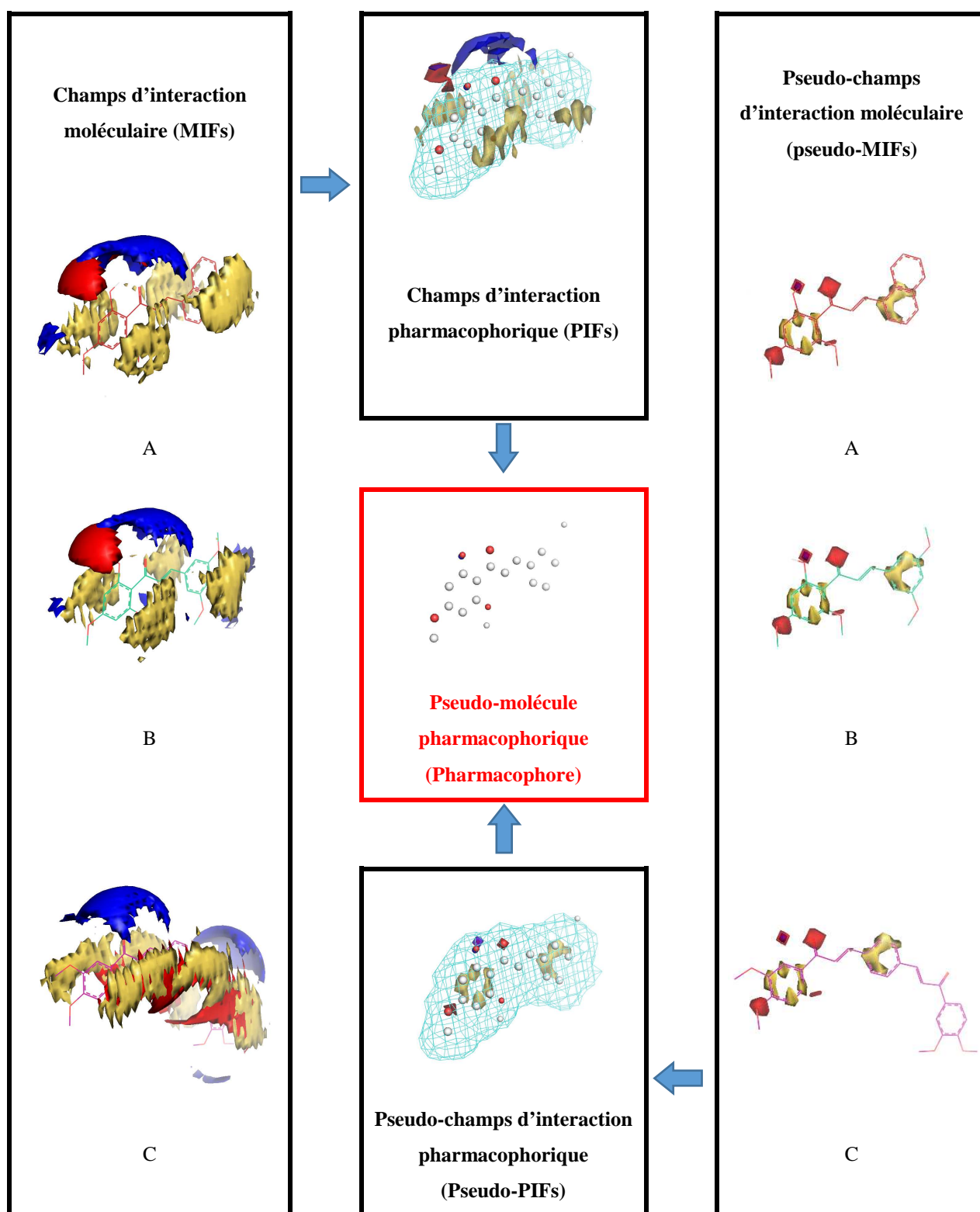


Figure 68 : Représentation des MIFs (à gauche) et pseudo-MIFs (à droite) correspondant à trois composés choisis (A, B et C). Au centre sont représentés le pharmacophore (milieu) généré par FLAP à partir de ces trois composés ainsi que les représentations du PIF (en haut) et du pseudo-PIF (en bas). En jaune sont représentées les interactions hydrophobes, en rouge les interactions hydrogènes accepteurs et en bleu les interactions hydrogènes donneurs.

○ Validation du pharmacophore par le criblage virtuel

Une fois le pharmacophore obtenu, il est nécessaire de le valider à l'aide d'un **criblage virtuel**. Un criblage virtuel est une procédure au cours de laquelle des structures candidates sont comparées à un modèle (pharmacophore ou récepteur biologique) afin de générer un degré de similarité, obtenu pour chaque sonde ou descripteur pris individuellement (H, DRY, O, N1) ou leur combinaison (ex : H*O*N1). Ces degrés de similarité correspondent au *probe score* décrit précédemment, c'est-à-dire au degré de superposition des champs d'interaction moléculaire correspondant à chaque descripteur (ou à leur combinaison) entre, cette fois-ci une molécule candidate et le modèle pharmacophore. Ces degrés de similarité sont ensuite utilisés afin de classer les molécules de la plus similaire à la moins similaire au modèle. Un criblage virtuel permet ainsi de vérifier si le modèle est capable ou non de discriminer les structures candidates selon le profil recherché et selon quel(s) descripteur(s).

Afin de valider un modèle pharmacophore, un criblage virtuel est effectué sur une base de données nommée *training set*, constituée de molécules actives connues et de molécules dites « leurres » ou inactives envers la cible étudiée. Chaque criblage pourra être réalisé en mode « champs », c'est-à-dire par superposition des champs d'interaction moléculaire ou bien en mode « pseudo-champs » par superposition des pseudo-champs d'interaction moléculaire.

À l'issue du criblage, une courbe appelée « *enrichment plot* » est obtenue pour chaque descripteur. Cette courbe représente le pourcentage de vrais positifs (axe des ordonnées) en fonction du pourcentage de faux positifs (axe des abscisses) pour une certaine série d'objets ordonnés.

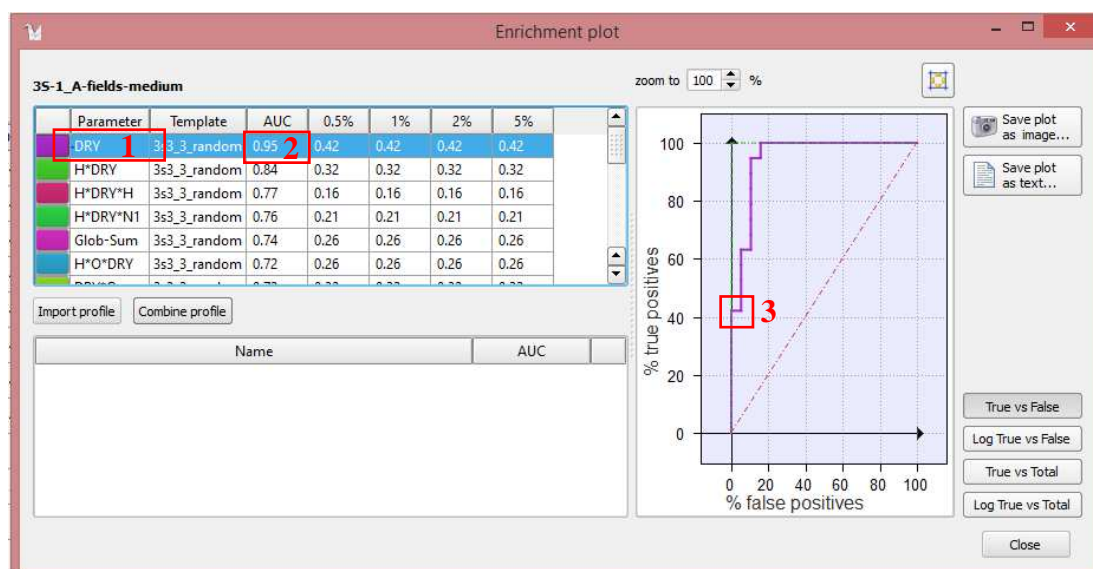


Figure 69 : Résultats obtenus à l'issue d'un criblage virtuel dans le logiciel FLAP. Exemple d'une courbe "enrichment plot" sur la droite de l'image.

Ces courbes permettent d'évaluer l'efficacité de chaque modèle. Plusieurs données peuvent être extraites de cette courbe :

- **l'aire sous la courbe** (AUC pour *Area Under the Curve*, annotation 2 sur la **Figure 69**): plus la valeur AUC sera proche de 1, plus le modèle parviendra à prédire correctement les activités des composés issus du training set. Lorsque le modèle n'est pas capable de discriminer les composés actifs des composés leurres, la valeur d'AUC est égale à 0,5 ;
- **le pourcentage de vrais positifs à 0% de faux positifs** (annotation 3 sur la **Figure 69**) : cette valeur permet de déterminer le pourcentage de composés actifs qu'est capable de prédire correctement le modèle étudié avant que le premier faux positif ne soit détecté.

Ces données permettent ainsi de déterminer quel descripteur est discriminant dans le modèle étudié. À titre d'exemple sur la **Figure 69**, pour le descripteur DRY, une AUC de 95% est obtenue avec 42% de composés actifs correctement prédits. Ainsi, on peut émettre l'hypothèse que se sont les interactions hydrophobes qui permettent une meilleure discrimination entre les molécules actives et les molécules leurres.

Un criblage virtuel permet ainsi valider ou non un modèle pharmacophore et de déterminer, s'il en existe plusieurs, lequel est le plus efficace.

III.3. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

III.3.1. Sélection des composés pour la création des pharmacophores pour les sites 3 et site4

FLAP n'a besoin que de 3 à 5 composés pour générer un modèle pharmacophore fiable.^{265, 266} Ainsi une première étape de ce travail a consisté à choisir ces composés parmi les bases de données disponibles. Afin d'effectuer cette tâche, deux approches ont été envisagées :

- une sélection dite « manuelle » réalisée par étude visuelle des structures des composés, en se basant sur nos connaissances de chimistes ;
- une sélection dite « automatisée » réalisée par le logiciel VolSurf+.

III.3.1.1 Sélection « manuelle »

Dans un premier temps, les 3 à 5 molécules utilisées pour la génération du pharmacophore ont été choisies par une étude visuelle des structures des composés. Deux critères ont guidé ces choix : l'activité inhibitrice d'ABCG2 ($EC_{50} \leq 1,5 \mu M$) et la structure des composés. Différentes combinaisons de composés ont été mise au point afin de s'assurer de couvrir le plus grand espace possible.

○ Sélection « manuelle » pour le site 3 (stimulation de l'activité ATPase basale)

La banque de données disponible pour le site 3 comprend 162 composés. Parmi eux, une première sélection de 5 composés puis 3 combinaisons de 3 composés ont été déterminées selon la méthode de sélection « manuelle ». Les structures et composés choisis sont résumés dans le **Tableau 20**.

CHAPITRE 2. MODULATION DE LA PROTÉINE ABCG2

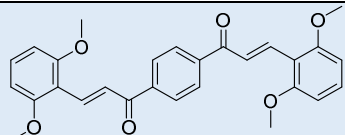
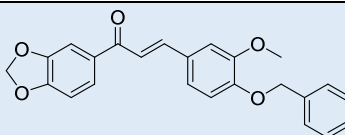
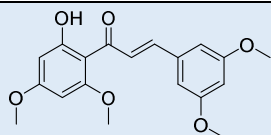
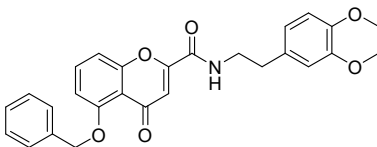
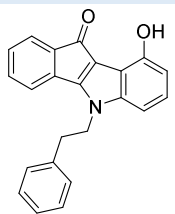
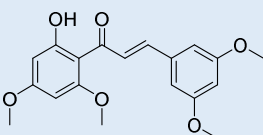
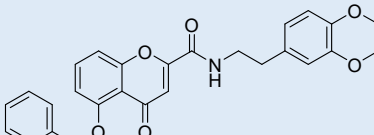
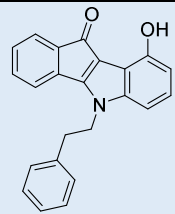
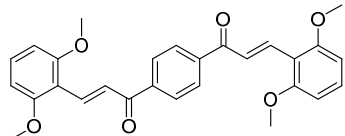
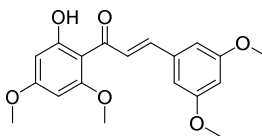
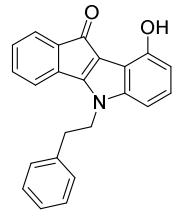
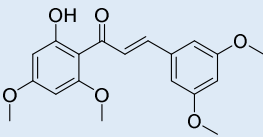
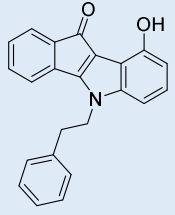
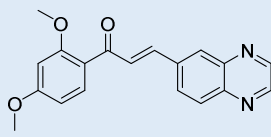
5 composés (5S)		
		
16s	57s	115s
		
136s	143s	
3 composés : 1 ^{ère} combinaison (3_1S)		
		
115s	136s	143s
3 composés : 2 ^{ème} combinaison (3_2S)		
		
16s	115s	143s
3 composés : 3 ^{ème} combinaison (3_3S)		
		
115s	143s	154s

Tableau 20 : Sélection "manuelle" des composés appartenant au site 3.

- Sélection « manuelle » pour le site 4 (inhibition de l'activité ATPase basale)

La banque de données disponible pour le site 4 comprend 25 composés. De la même manière que pour le site 3, une première sélection de 5 composés puis 3 combinaisons de 3 composés

CHAPITRE 2. MODULATION DE LA PROTÉINE ABCG2

ont été déterminées selon la méthode de sélection « manuelle ». Les structures et composés choisis sont résumés dans le **Tableau 21**.

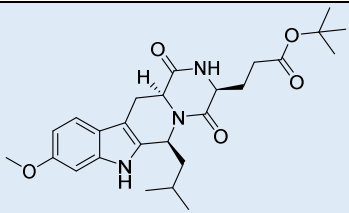
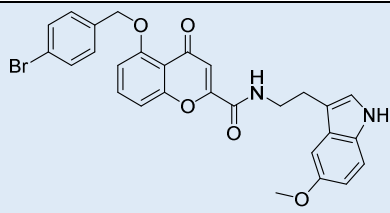
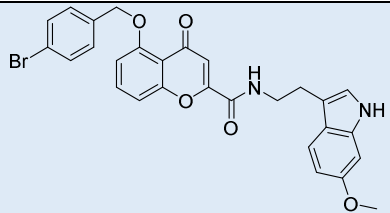
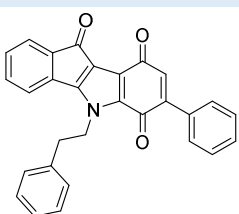
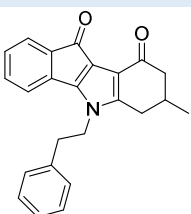
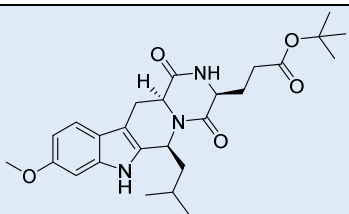
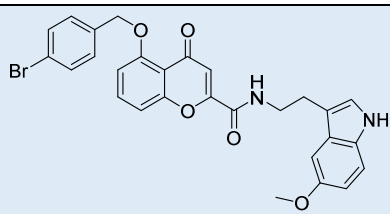
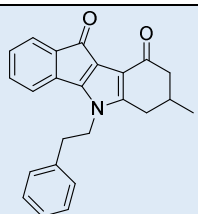
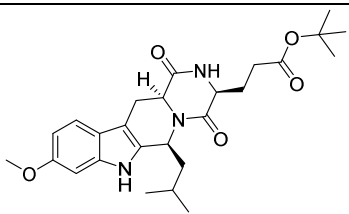
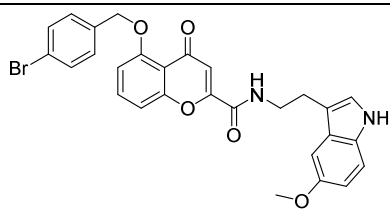
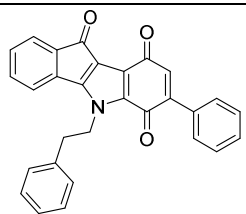
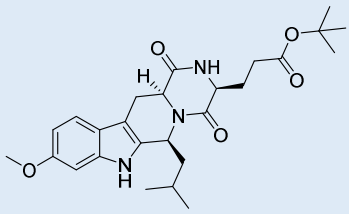
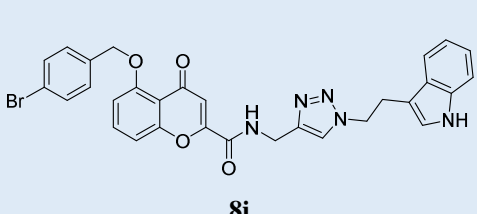
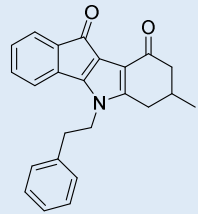
5 composés (5I)		
		
Ko143	MBL-II-141	3i (alias composé 17f)
		
18i	24i	
3 composés : 1 ^{ère} combinaison (3_1I)		
		
Ko143	MBL-II-141	24i
3 composés : 2 ^{ème} combinaison (3_2I)		
		
Ko143	MBL-II-141	18i
3 composés : 3 ^{ème} combinaison (3_3I)		
		
Ko143	8i	24i

Tableau 21 : Sélection "manuelle" des composés appartenant au site 4.

III.3.1.2 Sélection « automatisée »

Dans un second temps furent sélectionnés les composés grâce au logiciel VolSurf+. Pour chaque site, une sélection a été réalisée à partir des composés les plus actifs en termes d'inhibition par rapport à ABCG2 (EC_{50}). Le but de cette application est de sélectionner, au sein d'une base de données, un certain nombre de composés de structure et propriétés pharmacochimiques et physico-chimiques différentes.

○ Sélection « automatisée » pour le site 3 (stimulation de l'activité ATPase basale)

Parmi les 162 composés démontrant une stimulation de l'activité ATPase basale, 39 composés présentent une EC_{50} inférieure à 1,5 μ M. La sélection a ainsi été réalisée à partir de cette banque de données. Les séries des 3 et 5 composés choisis par VolSurf+ sont résumées dans le **Tableau 22**. La **Figure 70** représente la carte de projection des composés étudiés, issue du modèle PLS. Les points jaunes localisent les composés sélectionnés par VolSurf+.

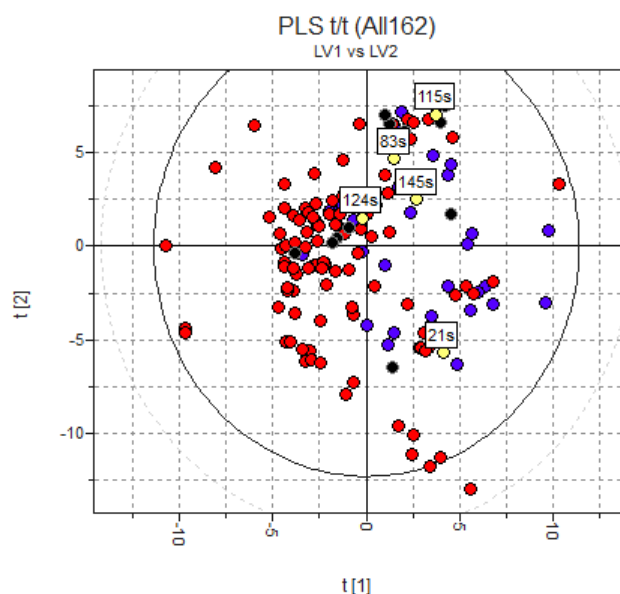


Figure 70 : Sélection des composés du site 3 par le logiciel VolSurf+ dans l'espace chimique. Projection des composés dans le modèle PLS. Les points rouges représentent les composés les moins actifs (%inhibition $\leq 70\%$ et $EC_{50} > 1,5 \mu$ M), les points bleus représentent les composés les plus actifs ($EC_{50} \leq 1,5 \mu$ M), les points noirs représentent les composés possédant un pourcentage d'inhibition supérieur ou égal à 70% mais dont les EC_{50} n'ont pas été déterminés et les points jaunes représentent les composés sélectionnés par VolSurf+.

CHAPITRE 2. MODULATION DE LA PROTÉINE ABCG2

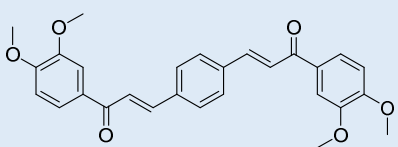
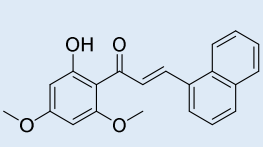
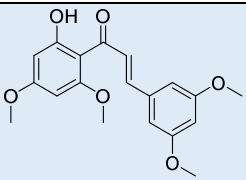
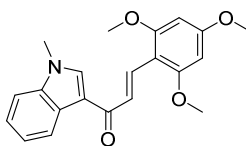
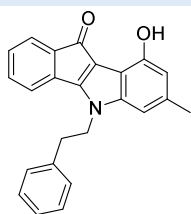
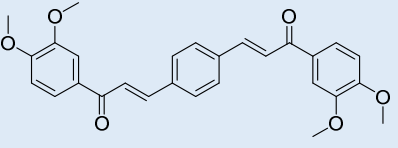
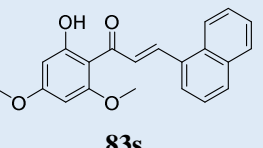
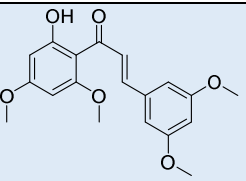
5 composés (5S_VolSurf)		
 21s	 83s	 115s
 124s	 145s	
3 composés (3S_VolSurf)		
 21s	 83s	 115s

Tableau 22 : Composés du site 3 sélectionnés par VolSurf+.

- *Sélection avec VolSurf+ pour le site 4 (inhibition de l'activité ATPase basale)*

Parmi les 25 composés démontrant une stimulation de l'activité ATPase basale, 19 composés présentent un pourcentage d'inhibition supérieur à 70% et une EC₅₀ inférieure à 2 µM. La sélection a ainsi été réalisée à partir de cette banque de données.

Il est également possible d'ajouter une contrainte dans la sélection, c'est-à-dire d'imposer de garder un ou plusieurs composés. Ainsi les composés Ko143 et **MBL-II-141**, composés les plus actifs en terme d'inhibition d'ABCG2 et de structures différentes ont été volontairement gardés lors de la sélection.

Les séries des 3 et 5 composés choisis par VolSurf+ sont résumées dans le **Tableau 23**. La **Figure 71** représente la carte de projection des composés étudiés, issue du modèle PLS. Les points jaunes localisent les composés sélectionnés par VolSurf+.

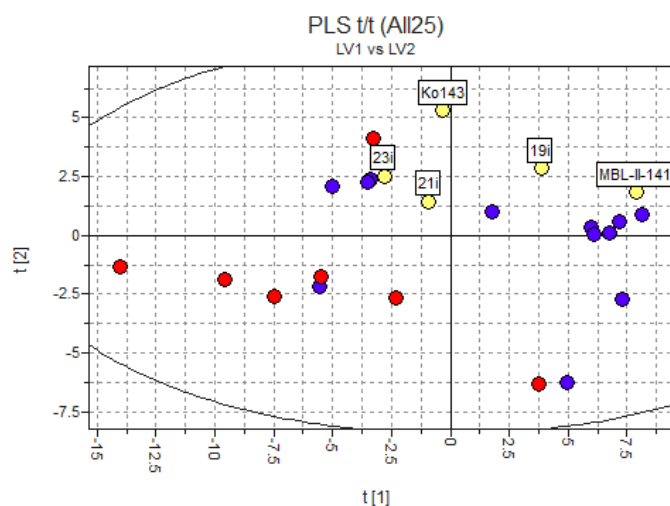
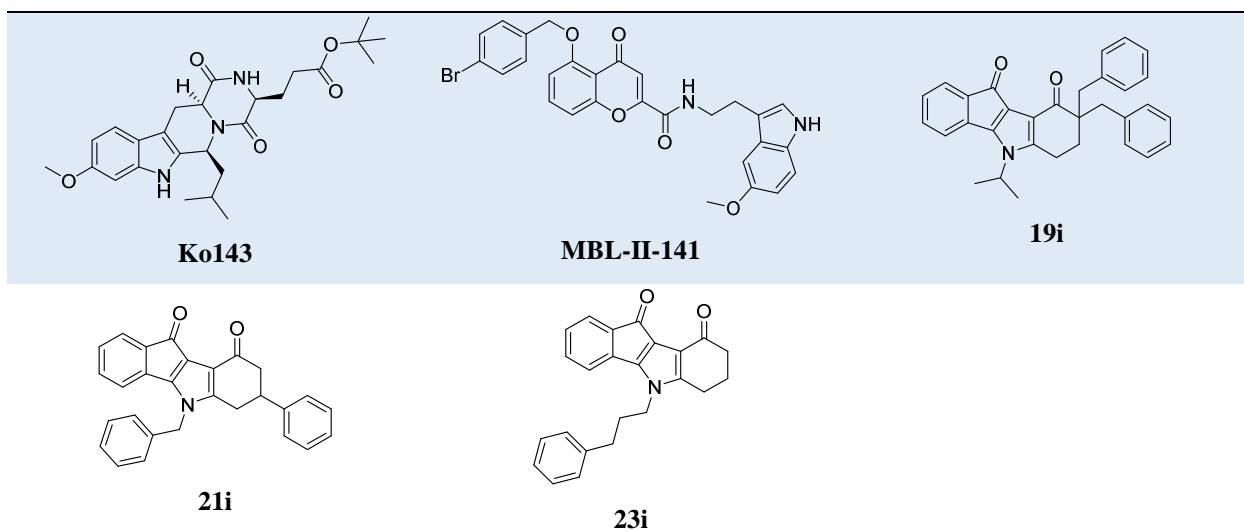


Figure 71 : Sélection des composés du site 4 par le logiciel VolSurf+ dans l'espace chimique (en jaune).

5 composés (5I_VolSurf)



3 composés (3I_VolSurf)

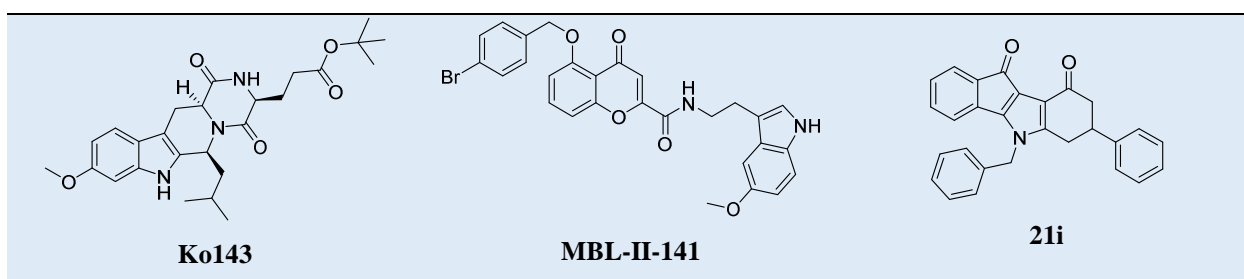


Tableau 23 : Composés du site 4 sélectionnés par VolSurf+.

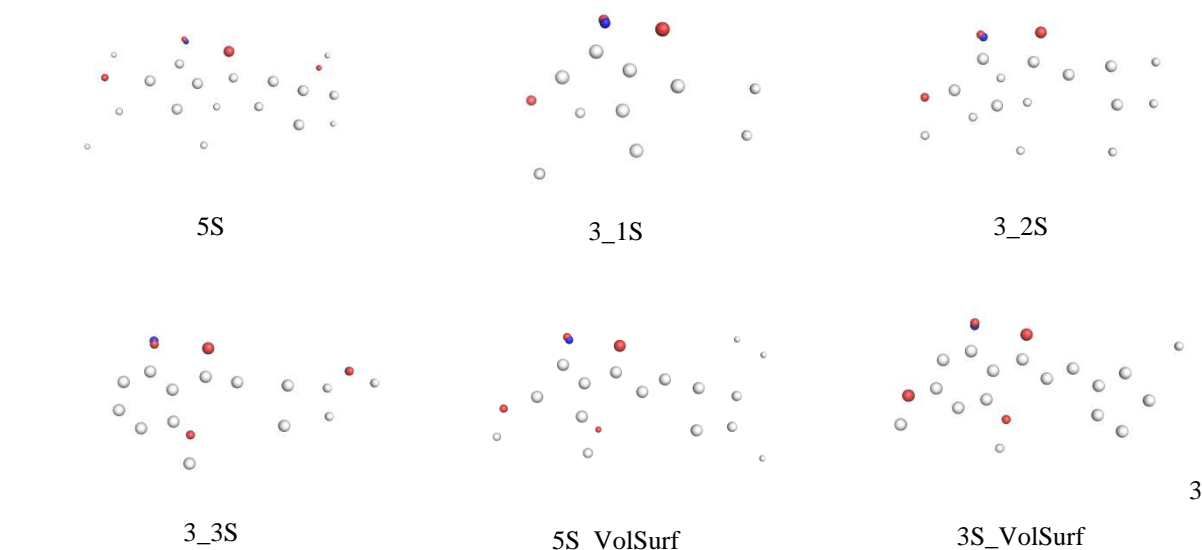
III.3.2. Génération des modèles pharmacophores pour les sites 3 et 4

La seconde étape de ce travail a été la réalisation des modèles pharmacophoriques à partir de chacune des bases de données sélectionnées par le logiciel FLAP. Afin de créer un modèle pharmacophorique, il est nécessaire de générer dans un premier temps les bases de données au sein de FLAP. FLAP est capable de générer l'ensemble des conformations, formes stéréoisomères et tautomères et états de transition (grâce au logiciel MoKa,^{267, 268} incorporé au sein de FLAP) de chaque composé inclu dans la base de données mais également leurs MIFs. Pour la création de nos bases de données, les dix tautomères à pH 7,4 de chaque composé ont été utilisés. Les analyses conformationnelles ont été réalisées, de manière aléatoire, en choisissant 50 conformères par molécules, éliminant ceux possédant un RMSD (*Root Mean Square Deviation*, mesure de la distance moyenne entre les atomes de deux molécules superposées) inférieur à 0,2 Å l'un de l'autre. Pour la génération des MIFs, les sondes GRID choisies sont H, DRY, N1 et O avec une résolution de 0,75 Å pour la forme de la grille.

L'étape suivante consiste en la construction des modèles pharmacophoriques à partir de chacune des bases de données créées. Ainsi au total, 6 modèles pharmacophoriques ont été générés pour chacun des sites (**Tableau 24**).

CHAPITRE 2. MODULATION DE LA PROTÉINE ABCG2

Site « Stimulation de l'activité ATPasique basale » - Site 3



Site « Inhibition de l'activité ATPasique basale » - Site 4

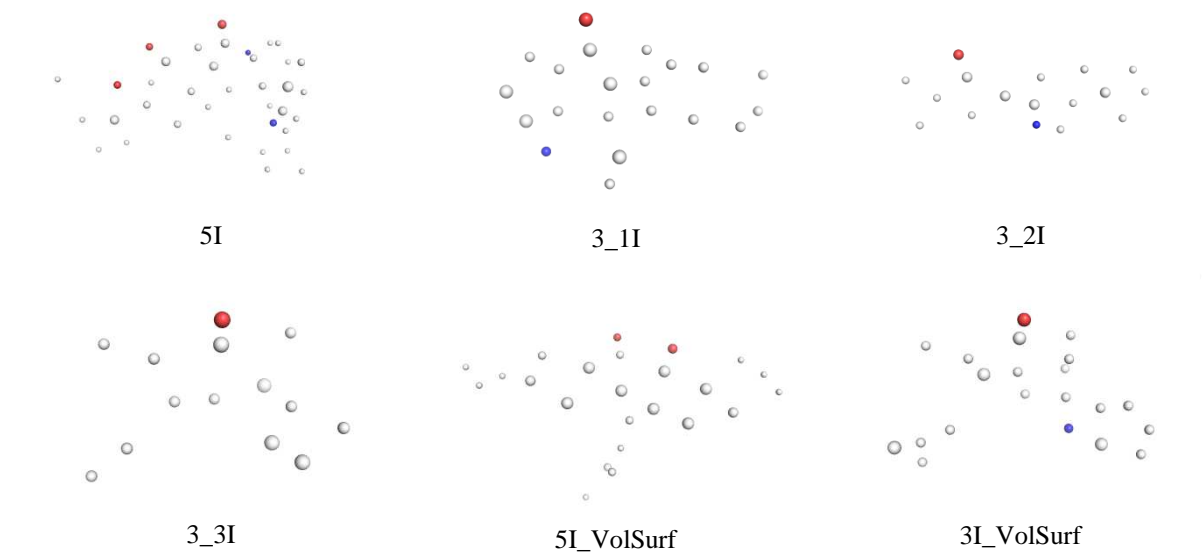


Tableau 24 : Représentation des pharmacophores correspondant à chacune des bases de données générées. Les points blancs représentent les points pharmacophoriques hydrophobes, les points rouges représentent les points pharmacophoriques liaison hydrogène-accepteur et les points bleus représentent les points pharmacophoriques liaison hydrogène-donneur.

Une fois ces modèles générés, il est maintenant indispensable de sélectionner et de valider un unique pharmacophore pour chacun des deux sites. Ceci est rendu possible grâce à un criblage virtuel.

III.3.3. Comparaison et sélection des meilleurs modèles pharmacophores

Afin de choisir et de valider un pharmacophore pour les sites 3 et 4, il est nécessaire de réaliser un criblage virtuel. Un criblage basé sur les pharmacophores générés a été réalisé sur une base de données de composés actifs et inactifs connus (*training set*). Ceci nous a ainsi permis de vérifier si nos pharmacophores étaient capables de distinguer les composés du site 3 et du site 4 et de sélectionner le meilleur modèle parmi les 6 générés pour chaque site.

III.3.3.1 Mise au point de la base de données utilisée pour le criblage (*training set*)

Afin de réaliser le criblage virtuel, il était nécessaire de mettre en place une base de données constituée d'inhibiteurs actifs d'ABCG2 appartenant au site 3 ainsi qu'au site 4. Parmi les 25 composés appartenant au site 4 disponibles, 19 se révèlent être des inhibiteurs actifs d'ABCG2 ($EC_{50} \leq 1,5 \mu M$). Parmi les 39 inhibiteurs actifs d'ABCG2 appartenant au site 3, 19 ont ainsi également été sélectionnés par le logiciel VolSurf+. Les 38 composés formant le *training set* sont décrits en annexe III.

III.3.3.2 Criblage virtuel basé sur le pharmacophore

Lors de la réalisation d'un criblage virtuel, il est possible d'ajouter des **contraintes** au pharmacophore afin d'imposer, lors du criblage, une ou deux caractéristiques au modèle. En effet, certains points pharmacophoriques sont conservés entre les différents modèles pour un même site. Il est donc intéressant d'imposer ces points dans la recherche du meilleur modèle.

○ Sélection du pharmacophore du site 3

Le criblage virtuel de la librairie « *training set* » a été réalisé pour chacun des six modèles pharmacophores générés pour le site 3 afin de déterminer lequel est capable de discriminer au mieux les composés du site 3 des composés du site 4.

Dans ce cas, les composés appartenant au site 3 ont été caractérisés comme « actifs » et les composés appartenant au site 4 comme « leurres » ou « inactifs ».

Lorsque l'on compare les différents modèles pharmacophores, on remarque que certains points pharmacophoriques semblent être conservés entre les différents modèles, tels qu'un site accepteur de liaison hydrogène (site A), ainsi que deux sites accepteur/donneur de liaison hydrogène (site A/D) situés l'un à côté de l'autre (**Figure 72**).

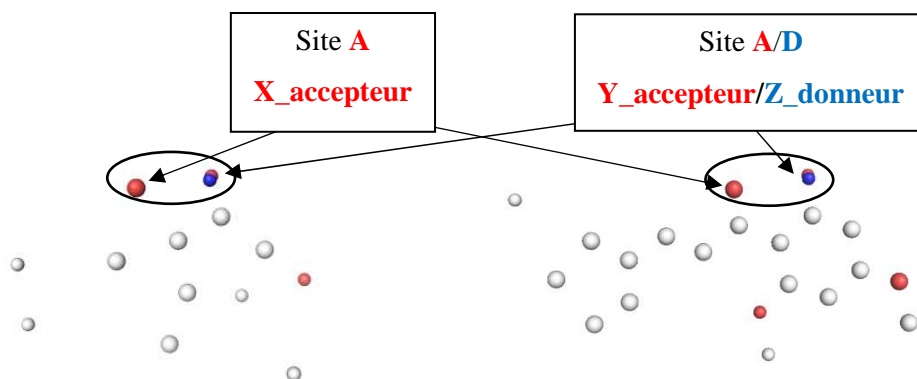


Figure 72 : Sites conservés entre les pharmacophores du site 3 (à gauche, modèle 5S et à droite, modèle 3S_VolSurf).

Différents criblages, en mode champs et en mode pseudo-champs, ont ainsi été réalisés en imposant différents jeux de contraintes (soit X, Y, Z le numéro attribué par FLAP à ces trois points pharmacophoriques) :

- X_accepteur (site A)
- Y_accepteur (site A/D)
- Z_donneur (site A/D)
- X_accepteur ET Y_accepteur
- X_accepteur ET Z_donneur
- Y_accepteur ET Z_donneur

Pour chaque criblage ont été déterminées les courbes *enrichment plot*. A partir de ces courbes ont pu être définies les valeurs des aires sous la courbe et les descripteurs capables de discriminer le plus efficacement possible les composés actifs des composés inactifs. L'ensemble de ces données, rassemblées dans le tableau A en annexe IV, vont nous permettre d'émettre certaines hypothèses quant au site 3 et de choisir le modèle le plus prédictif.

CHAPITRE 2. MODULATION DE LA PROTÉINE ABCG2

Différentes observations et conclusions peuvent être déduites des valeurs AUC obtenues suite aux différents criblages virtuels :

- la présence d'un groupement accepteur en position X ou Y semble être une contrainte nécessaire à une bonne discrimination entre les sites 3 et 4 (ex : pour 3S_VolSurf : AUC (contrainte Z_donneur) = 0,60 alors que AUC (contrainte X_accepteur) = 0,94 et AUC (contrainte Y_accepteur) = 0,84 pour PIFs) ;
- de manière générale, les meilleurs résultats sont obtenus pour la contrainte X_accepteur. De plus, dans la totalité des modèles, les descripteurs associés à ces conditions sont DRY ou H*DRY. Ceci sous-entend ainsi que les interactions hydrophobes semblent être importantes pour la cavité du site 3.

Grâce à l'aspect des courbes *enrichment plots* et aux valeurs des aires sous la courbes, il est possible de déterminer quel pharmacophore représente de manière la plus concluante le site 3.

Parmi l'ensemble des modèles testés, trois modèles présentent une valeur AUC proche ou supérieure à 0,90 pour les PIFs et pseudo-PIFs :

- 3_3S, avec pour contrainte : 1_accepteur ;
- 5S_VolSurf, avec pour contrainte : 1_accepteur ;
- 3S_VolSurf, avec pour contrainte : 1_accepteur.

Le **Tableau 25** rassemble les résultats obtenus pour chacun de ces modèles, observés pour les modes champs et pseudo-champs. Pour chacun des modèles sont attribués les valeurs des aires sous la courbe (AUC), les pourcentages de composés actifs correctement prédits par chaque modèle (% (vrai positifs)), le meilleur descripteur ainsi que le *score probe* correspondant.

CHAPITRE 2. MODULATION DE LA PROTÉINE ABCG2

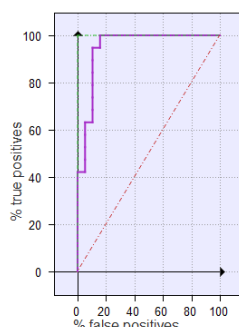
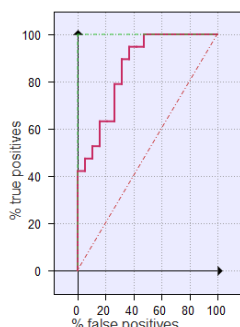
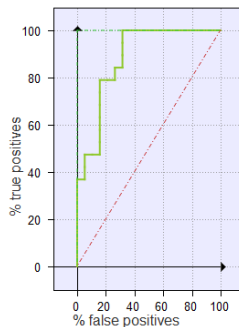
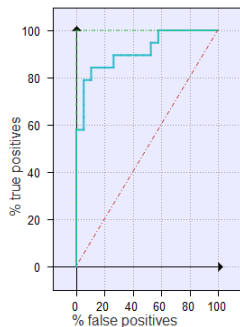
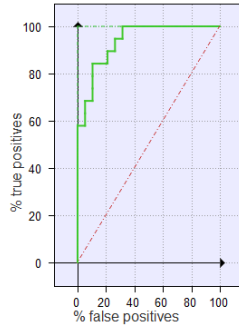
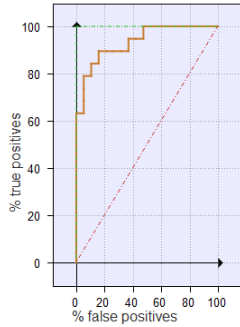
Modèles	Contraintes	Résultats	
		PIFs	PseudoPIFs
3_3S	1_accepteur		
		AUC = 0,95	AUC = 0,86
		% (vrai-positifs) = 42%	% (vrai-positifs) = 42%
		Descripteur = DRY	Descripteur = DRY
		Score probe = 0,401	Score probe = 0,649
5S_VolSurf	1_accepteur		
		AUC = 0,88	AUC = 0,91
		% (vrai-positifs) = 37%	% (vrai-positifs) = 58%
		Descripteur = DRY	Descripteur = DRY
		Score probe = 0,382	Score probe = 0,567
3S_VolSurf	1_accepteur		
		AUC = 0,94	AUC = 0,93
		% (vrai-positifs) = 58%	% (vrai-positifs) = 63%
		Descripteur = H*DRY	Descripteur = DRY
		Score probe = 0,419	Score probe = 0,661

Tableau 25 : Tableau rassemblant les résultats issus des criblages pour les trois meilleurs modèles sélectionnés.

De ces valeurs, nous pouvons conclure que le modèle capable de prédire le plus grand nombre de composés actifs (appartenant au site 3) est le modèle **3S_VolSurf / 1_accepteur**. En effet, ce modèle présente des AUC égales à 0,94/0,93 et est capable de prédire correctement 58%/63% des composés actifs du training set respectivement pour le mode champs avec pour descripteur H*DRY et pour le mode pseudo-champs avec pour descripteur DRY.

La représentation du modèle pharmacophore choisi par le logiciel de visualisation moléculaire PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3 Schrödinger, LLC) est présentée **Figure 73**.

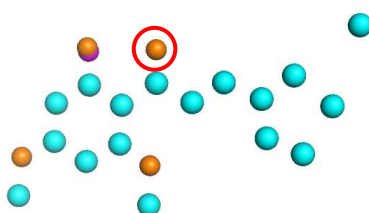


Figure 73 : Représentation sur PyMOL du pharmacophore sélectionné 3S_VolSurf / 1_accepteur en mode pseudo-champs (contrainte sélectionnée entourée en rouge). Les points orange représentent les points pharmacophoriques accepteurs (O), le point rose représente le point pharmacophorique donneur (N1) et les points bleus représentent les points pharmacophoriques hydrophobes (DRY).

○ *Sélection du pharmacophore du site 4*

Un criblage virtuel a été réalisé pour chacun des six pharmacophores générés pour le site 4 afin de déterminer lequel était capable de discriminer au mieux les composés du site 4 des composés du site 3.

Tout comme pour le site 3, il est possible d'ajouter des contraintes au pharmacophore afin d'imposer, lors du criblage, une ou deux caractéristiques au modèle. Contrairement au site 3, moins de points sont conservés entre les modèles pharmacophores. Ainsi pour chaque modèle, toutes les contraintes correspondant aux points liaisons hydrogène donneur/accepteur ont été testées. Les résultats de l'ensemble des criblages réalisés pour le site 4 sont résumés dans le tableau B en annexe IV.

D'après ces résultats, nous pouvons déduire que :

- les contraintes localisées au niveau des sites accepteurs conduisent à de meilleurs résultats que les contraintes localisées au niveau des sites donneurs ;

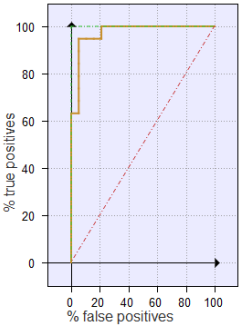
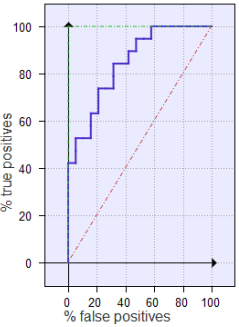
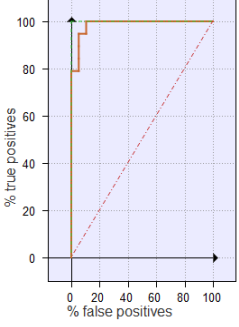
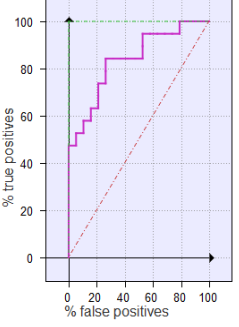
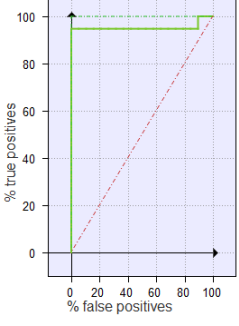
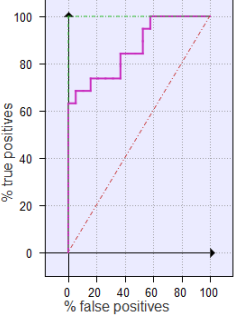
- pour chaque modèle, les paramètres associés aux meilleures conditions sont les paramètres O, N1 et H. Ceci suppose ainsi que des propriétés de formes et de polarité caractérisent la cavité du site 4.

D'après les résultats obtenus par le criblage virtuel, six modèles présentent des valeurs d'aire sous la courbe supérieures à 0,90% :

- 5I sans contrainte ;
- 5I avec pour contrainte 19_accepteur ;
- 5I avec pour contrainte 20_accepteur ;
- 3I_1 sans contrainte ;
- 3I_1 avec pour contrainte 1_accepteur ;
- 3I_2 sans contrainte.

Le **Tableau 26** rassemble les résultats obtenus pour chacun de ces modèles, observés pour les modes champs et pseudo-champs. Pour chacun des modèles sont attribuées les valeurs des aires sous la courbe (AUC), les pourcentages de composés actifs correctement prédits par chaque modèle (% (vrai positifs)), le meilleur descripteur ainsi que le *score probe* correspondant.

CHAPITRE 2. MODULATION DE LA PROTÉINE ABCG2

Modèles	Contraintes	Résultats	
		PIFs	PseudoPIFs
5I	Sans contrainte	 <p>AUC = 0,97 % (vrai-positifs) = 63% Descripteur = H*O*N1 Score probe = 0,070</p>	 <p>AUC = 0,84 % (vrai-positifs) = 42% Descripteur = Glob-Prod Score probe = 0, 582</p>
		 <p>AUC = 0,99 % (vrai-positifs) = 79% Descripteur = N1*O Score probe = 0,128</p>	 <p>AUC = 0,84 % (vrai-positifs) = 47% Descripteur = O Score probe = 0,584</p>
		 <p>AUC = 0,95 % (vrai-positifs) = 95% Descripteur = H*O*N1 Score probe = 0,064</p>	 <p>AUC = 0,86 % (vrai-positifs) = 63% Descripteur = Glob-Prod Score probe = 0,555</p>

CHAPITRE 2. MODULATION DE LA PROTÉINE ABCG2

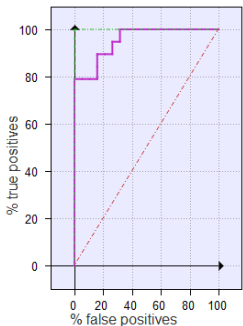
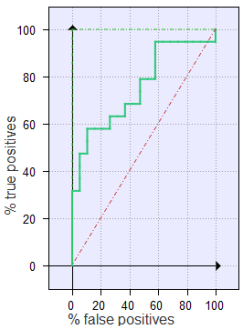
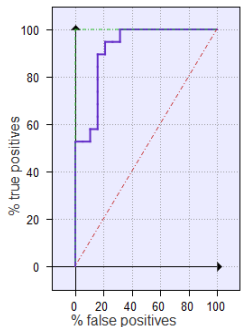
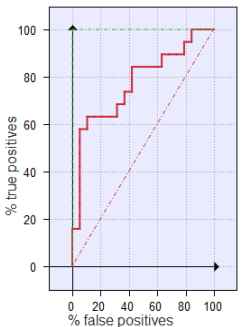
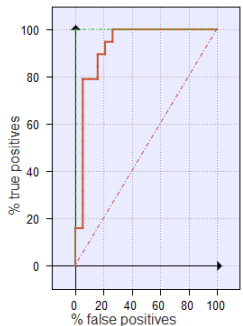
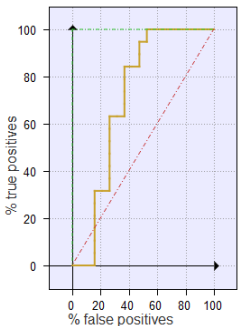
3I_1	Sans contrainte		
		AUC = 0,95 % (vrai-positifs) = 79% Descripteur = H*O*N1 Score probe = 0,059	AUC = 0,75 % (vrai-positifs) = 32% Descripteur = Glob*Prod Score probe = 0,585
3I_1	1_accepteur		
		AUC = 0,92 % (vrai-positifs) = 53% Descripteur = H Score probe = 0,497	AUC = 0,77 % (vrai-positifs) = 16% Descripteur = Glob-Prod Score probe = 0,590
3I_2	Sans contrainte		
		AUC = 0.93 % (vrai-positifs) = 16% Descripteur = H*N1*H Score probe = 0,161	AUC = 0.71 % (vrai-positifs) = 0% Descripteur = O Score probe = 0,824

Tableau 26 : Tableau rassemblant les résultats issus des criblages pour les six meilleurs modèles sélectionnés.

D'après ces valeurs, il apparaît clairement que l'un des modèles de choix capable de prédire le plus grand nombre de composés actifs (appartenant au site 4) est le modèle **5I / 20_accepteur** en ce qui concerne le mode champs. En effet, ce modèle présente une AUC égale à 0,95 et est capable de prédire correctement 95% des composés actifs du training set. Il est nécessaire d'étudier plus en détails ce modèle afin de déterminer la crédibilité de ces résultats. En effet, comme on peut le voir, le *score probe* correspondant au descripteur H*O*N1 est de 0,064. Ainsi la variation des résultats est de l'ordre du centième. Une modification au centième n'étant pas significative, le modèle H*O*N1 peut être considéré comme un artefact.

Deux autres paramètres conduisent également à de bons résultats à partir de ce modèle : N1*O et Glob*Prod. Les résultats associés à ces différents paramètres sont résumés dans le **Tableau 27**.

Modèle	Descripteur	AUC	% (vrais positifs)	Probe Score
5I 20_accepteur	H*O*N1	0,95	95%	0,064
	N1*O	0,90	37%	0,140
	Glob-Prod	0,89	74%	0,306

Tableau 27 : Les trois meilleurs paramètres issus du criblage du modèle 5I / 20_accepteur en mode champs d'interaction.

Les descripteurs N1*O et Glob-P présentent des différences au dixième près faisant de ces deux descripteurs de bons candidats. Le descripteur Glob-P présente un pourcentage de prédiction de composés actifs largement supérieur au descripteur N1*O. Pour finir le modèle 5I / 20_accepteur étudié en mode pseudo-champ présente une AUC de 0,86, un pourcentage de prédiction de faux-positifs de 63% également pour le descripteur Glob-Prod et un *probe score* de 0,555. Nous choisirons ainsi ce modèle pour le site 4.

La représentation du modèle pharmacophore choisi par le logiciel de visualisation moléculaire PyMOL est présentée **Figure 74**.

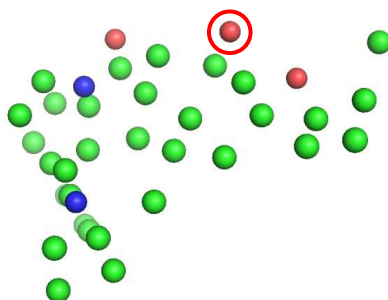


Figure 74 : Représentation sur PyMOL du pharmacophore sélectionné 5I / 20_accepteur (contrainte sélectionnée entourée en rouge). Les points rouges représentent les points pharmacophoriques accepteurs (O), les points bleus représentent le point pharmacophorique donneur (N1) et les points verts représentent les points pharmacophoriques hydrophobes (DRY).

III.3.3.3 Comparaison des modèles pharmacophores des sites 3 et 4

Suite aux criblages virtuels réalisés, des premières différences structurales apparaissent entre les deux sites 3 et 4. En effet, à la vue des paramètres obtenus, la cavité correspondante au site 3 semble être hydrophobe (DRY) alors que la cavité correspondante au site 4 semble être polaire (N1/O).

Lorsque l'on superpose les deux modèles obtenus à l'aide du logiciel FLAP (**Figure 75**), très peu de points pharmacophoriques sont conservés entre les modèles montrant ainsi les différences structurales existantes entre les deux possibles sites d'interaction.

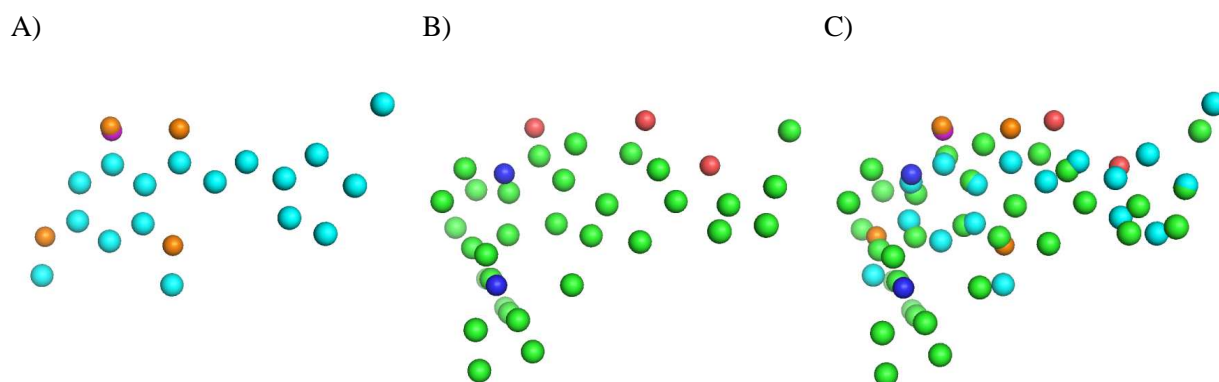


Figure 75 : Représentation sur PyMOL des modèles pharmacophores pour les sites 3 et 4. A) Modèle pharmacophore du site 3. B) Modèle pharmacophore du site 4. C) Superposition des modèles des sites 3 et 4.

Sur la **Figure 76**, nous pouvons comparer les champs d'interaction moléculaire correspondant aux différentes sondes GRID des deux pharmacophores.

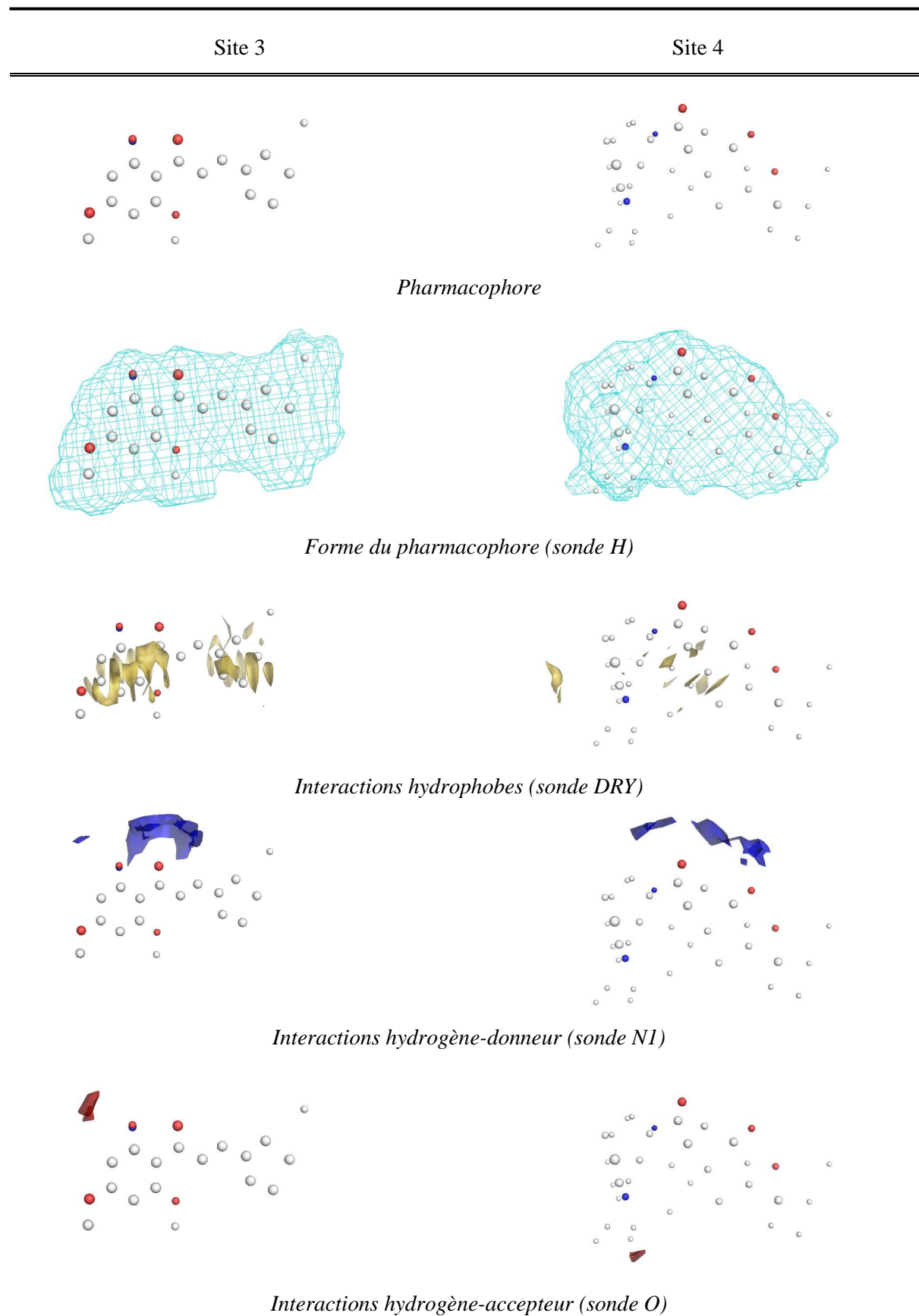


Figure 76 : Comparaison des champs d'interaction moléculaire entre les deux modèles pharmacophores des sites 3 et 4.

Les deux modèles pharmacophores étant désormais choisis pour chacun des sites, l'étape suivante consiste à réaliser un criblage sur une large banque de données (SPECS) afin de sélectionner les composés les plus actifs selon chaque modèle et tester ces derniers *in vitro*.

III.3.4. Criblages virtuels basés sur les pharmacophores et sélection des composés pour les tests *in vitro*

Afin de valider nos modèles et de vérifier leur prédictibilité, les composés sélectionnés, identifiés à partir des modèles pharmacophores comme appartenant à chacun des deux sites, seront testés *in vitro* par nos collaborateurs biologistes de l'IBCP de Lyon afin de déterminer leur activité ATPasique basale dans un premier temps, puis leur inhibition de l'activité de transport d'ABCG2. Ces résultats nous permettront ainsi de valider ou non nos pharmacophores.

III.3.4.1 Base de données utilisée

La banque de données SPECS est une banque de données de composés disponibles commercialement et couvrant une large diversité structurale (www.specs.net, 15/01/15). Cette banque de données, de taille conséquente, a été pré-filtrée à l'aide du logiciel FLAP, en prenant en compte la masse molaire. En effet, l'ensemble des composés actifs à notre disposition et appartenant au site 3 présente une masse moléculaire comprise entre 400 et 600 g.mol⁻¹ tandis que les composés appartenant au site 4 présentent une masse molaire comprise entre 300 and 650 g.mol⁻¹. Nous choisirons ainsi ces mêmes limites pour nos criblages. Ainsi, à l'issue de ces pré-filtrages, une base de données de 197478 composés a été utilisée pour être criblée virtuellement en utilisant comme modèle chacun des deux pharmacophores sélectionnés pour chaque site. Les formes protomères d'abondance inférieure à 20% à pH 7,4 ont été supprimées de la banque de données dans le but d'accélérer le criblage.

III.3.4.2 Sélection du set de composés pour le site 3

Le meilleur modèle pharmacophore pour le site 3 est le modèle 3S_VolSurf possédant la contrainte 1_accepteur. Concernant les PIFs, le descripteur sélectionné est H*DRY. Pour les pseudo-PIFs, le descripteur sélectionné est DRY.

CHAPITRE 2. MODULATION DE LA PROTÉINE ABCG2

Ainsi, un premier criblage virtuel a été réalisé sur les 200 premiers composés issus du pré-filtrage à l'aide de notre modèle pharmacophore en mode champs. Les 20 premières solutions selon le descripteur H*DRY ont été sélectionnées. Ce même travail a été réalisé en mode pseudo-champs et les 20 premières solutions selon le descripteur DRY ont été sélectionnées. L'ensemble des structures se trouve en annexe V.

En comparant les composés sélectionnés, nous remarquons que trois composés sont en commun entre les deux criblages virtuels effectués. Ces trois molécules seront ainsi sélectionnées pour les tests *in vitro*.

De plus, après une inspection visuelle, nous avons sélectionné trois composés issus du criblage selon le descripteur H*DRY et trois composés issus du criblage selon le descripteur DRY, couvrant la plus grande diversité structurale.

L'ensemble des 9 structures sélectionnées sont résumées dans le **Tableau 28**.

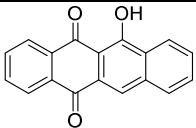
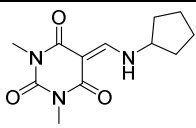
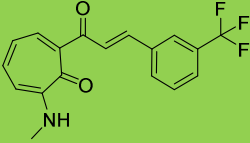
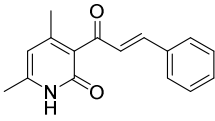
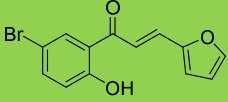
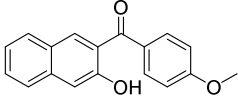
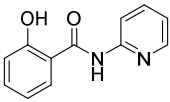
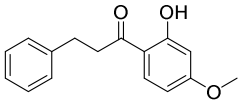
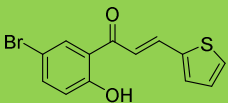
Référence	Structure	Référence	Structure
AE-641/00187058		AK-968_14004089	
AP-355/41582938		AG-690/36932102	
AN-646/41051369		AE-562/12222653	
AE-641/02605026		AK-087/42718243	
AN-646/41051368			

Tableau 28 : Composés sélectionnés soumis aux tests *in vitro* pour le site 3 (en vert sont les trois composés communs aux criblages virtuels en modalité PIFs et pseudo-PIFs).

Ces composés sont actuellement en cours de tests biologiques afin de déterminer leur activité ATPasique basale puis leur activité inhibitrice du transport d'ABCG2.

III.3.4.3 Sélection du set des composés pour le site 4

Le meilleur modèle pharmacophore pour le site 4 est le modèle 5I possédant la contrainte 20_accepteur. Le descripteur choisi pour ce modèle est Glob-P, en mode champs (PIFs) et pseudo-champs (pseudo PIFs).

Comme pour le site 3, un premier criblage virtuel a été réalisé sur les 200 premiers composés issus du pré-filtrage à l'aide de notre modèle pharmacophore. Les 20 premières solutions selon le descripteur Glob-Prod ont été sélectionnées.

Neuf composés, présentant la plus grande diversité structurale parmi ces 20 composés ont été sélectionnés par inspection visuelle pour être testés *in vitro* (**Tableau 29**).

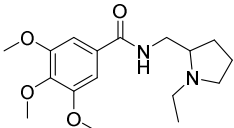
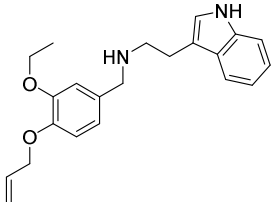
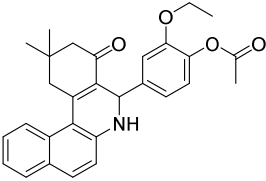
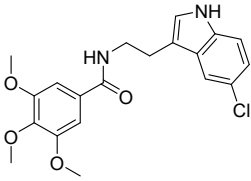
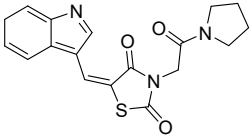
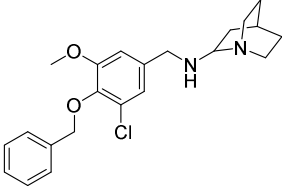
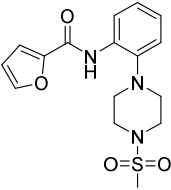
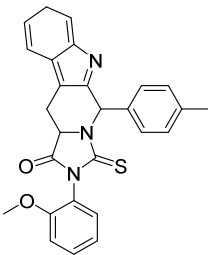
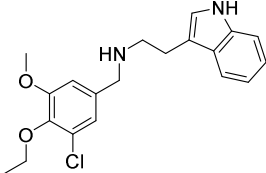
Référence	Structure	Référence	Structure
AG-205/13322024		AN-465/42887422	
AG-690/36158029		AO-022/43453359	
AH-487/41976616		AP-970/42525892	
AN-465/42885850		AQ-090/41728837	
AN-465/42887252			

Tableau 29 : Composés sélectionnés soumis aux tests *in vitro* pour le site 4.

Ces composés sont actuellement en cours de tests biologiques afin de déterminer leur activité ATPasique basale puis leur activité inhibitrice du transport d'ABCG2.

III.4. CONCLUSION

A l'issue de ce travail, nous avons créé deux modèles pharmacophores à l'aide du logiciel FLAP pour décrire les sites d'interaction 3 et 4 de la protéine ABCG2. A l'heure actuelle, il s'agit de la première étude portant sur ces deux sites d'interaction, mis en évidence très récemment. Grâce à ce travail, nous avons pu observer des différences structurales entre les deux sites d'interaction. Le site 3, conduisant à une stimulation de l'activité ATPasique basale, semble être gouverné par des interactions hydrophobes, tandis que ce sont les interactions polaires qui semblent dominer dans le site 4, conduisant à une inhibition de l'activité ATPasique basale.

La base de données SPECS a été criblée sur les deux pharmacophores. Ce criblage a permis de sélectionner deux jeux de 9 composés qui, respectivement stimulent/inhibent l'activité ATPasique basale d'ABCG2.

Dans l'hypothèse où les tests biologiques permettent de confirmer ces activités et donc l'efficacité de nos modèles pharmacophores, cette approche nous permettra d'une part, de prédire le comportement de nos futurs composés synthétisés et d'autre part de cribler différentes bases de données moléculaires et d'identifier de nouvelles structures pouvant constituer de potentiels nouveaux modulateurs d'ABCG2.

IV. Conclusion du chapitre 2

Ce travail a consisté d'une part en la synthèse puis en l'évaluation biologique de nouveaux inhibiteurs actifs, sélectifs et non toxiques d'ABCG2, analogues du **MBL-II-141**. La découverte de plusieurs sites d'interaction avec la protéine ainsi que des pharmacomodulations complémentaires permettront d'orienter nos futures synthèses afin d'améliorer l'activité inhibitrice. De plus, des études biologiques supplémentaires permettront de compléter la caractérisation ainsi que le comportement *in vivo* du **MBL-II-141**.

La recherche de nouveaux inhibiteurs d'ABCG2 a fait l'objet d'une revue dans le journal *Future Medicinal Chemistry*²⁶⁹ et d'un article paru dans le *Journal of Medicinal Chemistry*.²⁵⁴ L'ensemble des tests *in vivo* du **MBL-II-141**, réalisés par nos collaborateurs biologistes ont également fait l'objet d'un article dans le journal *Oncotarget*²⁴⁰. Un nouvel article est également en cours d'écriture afin de décrire les nouveaux composés encore non publiés.

Une seconde partie de ce projet a porté sur la modélisation de deux modèles pharmacophores pour chacun des deux principaux sites inhibiteurs d'ABCG2. Cette étude nous a permis de tirer quelques hypothèses préliminaires quant aux types d'interaction existantes entre chacun des sites et nos composés. L'étude biologique de l'activité ATPasique des nouveaux composés issus de la base de données SPECS et choisis par ces deux modèles nous permettra de confirmer ou non nos hypothèses.

C_{HAPITRE} **3.**

MODULATION DE LA PROTÉINE MRP1

Avant-propos

Le second axe de cette thèse porte sur le développement de nouveaux modulateurs de la protéine MRP1, dérivés de flavones et visant un nouveau profil pharmacologique : la sensibilité collatérale. En effet, l'objectif de ces nouveaux ligands sera d'induire un efflux massif de glutathion hors des cellules cancéreuses surexprimant MRP1, entraînant ainsi leur mort sélective par apoptose.

Les synthèses ont été effectuées au sein du Département de Pharmacochimie Moléculaire de Grenoble. Ce travail a été réalisé en étroite collaboration avec l'équipe du Dr. Hélène Cortay de l'IBCP de Lyon pour la réalisation de l'ensemble des tests *in vitro* sur les composés synthétisés.

Un second objectif sera également de comprendre le mécanisme d'action de nos composés sur la protéine MRP1. En effet, les ligands étudiés étant impliqués dans le transport massif de glutathion, espèce antioxydante permettant aux cellules de lutter contre les phénomènes de stress oxydant, nous nous sommes intéressés à la détermination de leur profil antioxydant. Cette étude a été réalisée au sein de la Section des Sciences Pharmaceutiques de l'Université de Genève en collaboration avec le Dr. Claudia Simões-Pires. Notons que cette dernière étude est encore au stade préliminaire, elle ne sera pas abordée dans ce manuscrit de thèse.

I. La protéine MRP1 : Structure, fonctions biologiques et implication dans le phénotype MDR

I.1. STRUCTURE ET FONCTIONS BIOLOGIQUES DE MRP1

I.1.1. Découverte de la protéine

La protéine MRP1 a été découverte en 1992 par l'équipe de Cole lors de l'observation d'une résistance à la doxorubicine sur une lignée cellulaire H69AR du cancer du poumon, non liée à la surexpression de la protéine P-gp, unique transporteur jusqu'alors mis en évidence dans les cas de chimiorésistance. Elle clone pour la première fois ce gène responsable du phénotype MDR codant pour une nouvelle protéine, MRP1 (*Multidrug Resistance associated Protein 1*).⁹⁰ Cette protéine est par la suite également appelée ABCC1 du fait de son appartenance à la famille C des transporteurs ABC.

I.1.2. Topologie de la membrane de MRP1

Les transporteurs ABCC peuvent être classés en deux groupes selon leur topologie :²⁷⁰⁻²⁷²

- les **ABCC courts** présentant une structure typique des transporteurs ABC, c'est-à-dire deux TMDs comprenant chacun 6 hélices α transmembranaires. Cette classe de transporteurs comprend CFTR, MRP4, MRP5, MRP8 et MRP10 ;
- les **ABCC longs** comprenant une région N-terminale supplémentaire d'environ 200 acides aminés et nommée TMD0. Ce domaine est relié à TMD1 par une boucle intracellulaire nommé ICL3 ou L0. Cette classe comprend MRP1, MRP2, MRP3, MRP6, MRP7, SUR1 et SUR2A/SUR2B.

CHAPITRE 3. MODULATION DE LA PROTÉINE MRP1

MRP1 est ainsi un transporteur ABCC long, de 190 kDa et comporte 1531 acides aminés. Cette protéine est formée par l'alternance de cinq domaines, deux domaines nucléotidiques cytoplasmiques et trois domaines transmembranaires (TMD0, TMD1 et TMD2) comprenant un total de 17 hélices transmembranaires (TMs). Tandis que TMD0 possède 5 TMs, les domaines TMD1 et TMD2 possèdent chacun 6 TMs. TMD0 est relié à TMD1 par une boucle cytosolique intracellulaire L0 ou ICL3 d'environ 120 acides aminés et dont le groupement NH₂-terminal est extracellulaire (**Figure 77**).²⁷³⁻²⁷⁷

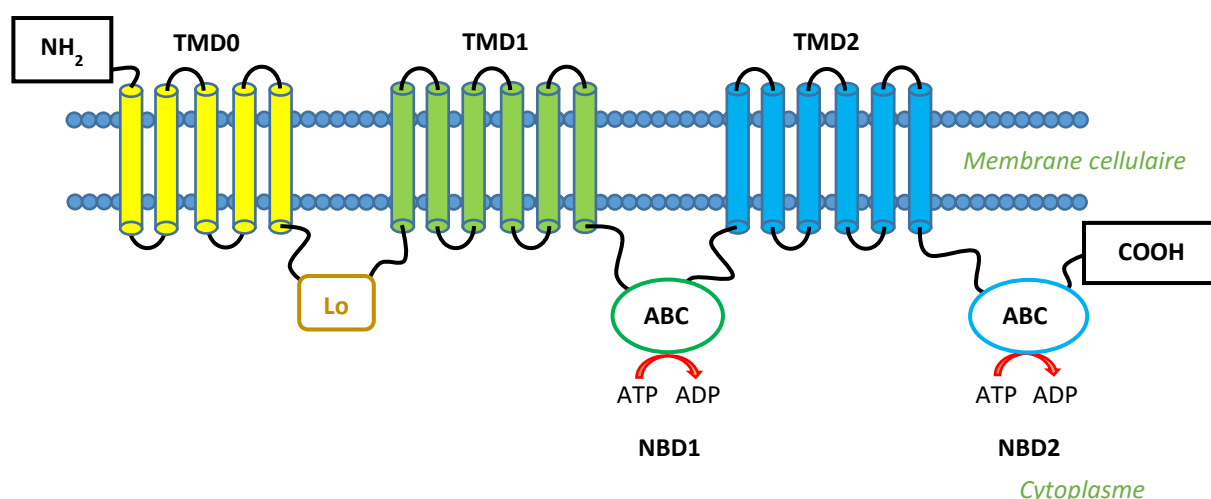


Figure 77 : Topologie générale de MRP1.

Les rôles et fonctions exacts assumés par TMD0, ICL3 et le groupement NH₂-terminal dans la fixation et la fonction de MRP1 sont encore peu connus. Différentes études de MRP1 ont d'ores et déjà démontré que les résidus appartenant aux domaines TMD1 et TMD2 sont importants pour la liaison et le transport d'un grand nombre de substrats.²⁷⁸⁻²⁸² Des suppressions partielles et des mutations envers des acides aminés spécifiques de TMD0 peuvent interférer avec l'activité de la protéine.²⁸³⁻²⁸⁵ Ces mutations semblent également être impliquées dans le repliement de la protéine puisque la suppression de TMD0 n'entraîne aucune conséquence sur l'activité de transport.^{286, 287} Cependant, TMD0 ainsi qu'une portion de la boucle ICL3 sont nécessaires pour la rétention de MRP1 à la surface cellulaire, et contiennent, du moins partiellement, des éléments permettant le traitement et la signalisation de MRP1.²⁸⁸

Une des caractéristiques de l'ensemble des transporteurs ABC est la présence de deux NBDs, s'associant sous la forme d'un dimère afin d'assurer la fonction de transporteur. Bien que les NBDs soient des domaines bien conservés entre les transporteurs ABC, certaines particularités différencient MRP1 des autres protéines. D'une part, les deux NBDs ne sont pas

équivalents vis-à-vis de l'hydrolyse de l'ATP. L'affinité de NBD1 pour l'ATP est en effet deux à trois fois supérieure à celle du NBD2, ce dernier étant le site de l'hydrolyse de l'ATP.²⁸⁹ Alors que la fixation et l'hydrolyse de l'ATP sur le NBD2 sont dépendantes de la fixation de l'ATP sur NBD1, la fixation de l'ATP sur NBD1 est indépendante de la fixation et de l'hydrolyse de l'ATP sur le NBD2, et s'observe également en l'absence de NBD2.²⁹⁰ Cette asymétrie semble être caractéristique des protéines ABCC. Une seconde différence réside dans le nombre d'acides aminés constituant les NBDs. En effet, MRP1 présente une délétion de 13 acides aminés au sein de NBD1, entre le motif Walker A et la boucle Q. Cependant, ces acides aminés sont présents au sein de NBD2 de même que dans l'ensemble des NBDs des transporteurs ABC eucaryotes.²⁹¹ De plus, le résidu glutamate qui suit le motif B de Walker chez la plupart des transporteurs ABC, résidu impliqué dans le clivage de la liaison β - γ phosphodiester de l'ATP est présent dans le NBD2 mais est remplacé par un aspartate dans le NBD1. Ces différences entre NBD1 et NBD2 semblent ainsi jouer un rôle dans la faible activité ATPasique de MRP1 dans sa globalité et plus particulièrement dans la quasi-absence de l'hydrolyse de l'ATP de NBD1.²⁹²

Deux sites de glycosylation sont localisés à proximité de l'extrémité *N*-terminale, sur les résidus 19 et 23 et un troisième site de *N*-glycosylation se situe sur le résidu Asn₁₀₀₆ sur la première boucle du TMD2 en position *C*-terminale.²⁷² La glycosylation ne semble pas nécessaire au transport ni à la spécificité des substrats.²⁷¹

Pour finir, MRP1 serait hautement phosphorylé et ces phosphorylations seraient métaboliquement actives, subissant alternativement des cycles de phosphorylation et de déphosphorylation. La boucle intracellulaire ICL1 reliant NBD1 et TMD2 semble être un site hautement phosphorylé, sur les sérines 871, 915, 930 et 961. Certains de ces groupements phosphates semblent d'ailleurs jouer un rôle important dans la modulation de l'accumulation d'agents médicaments au sein de cellules résistantes.²⁹³ Cette phosphorylation semble également être impliquée dans l'interaction de MRP1 avec les tubulines α et β et l'ATP synthase α .²⁹⁴ De plus, après avoir démontré que la fonction d'Ycf1p, homologue de MRP1 dans *Saccharomyces cerevisiae* est régulée par la phosphorylation des résidus Ser₂₅₁ et Ser₉₀₈ par la caséine kinase 2 α de levure (Cka1p),^{295, 296} l'équipe de Paumi a mis en évidence que MRP1 est régulée par la phosphorylation du site Thr₂₄₉ par la caséine kinase humaine (CK2 α), homologue humain de Cka1p.²⁹⁷

I.1.3. Éluclation de la structure et modèle par homologie

En absence de données structurales haute résolution, la construction de modèle par homologie a permis d'apporter quelques éléments quant au mécanisme de transport de MRP1. Mais ces études sont tout de même à prendre avec précaution. En effet, un premier modèle des domaines transmembranaires de MRP1 a été élaboré à partir de la structure cristalline du transporteur ABC bactérien MsbA sous la forme d'un homodimère.²⁷⁸ Cependant, il a été reconnu par la suite que ce modèle était incorrect. En effet, la découverte de la structure cristalline résolue à 3,0 Å du transporteur Sav1866, homologue bactérien de MRP1 issu de *Staphylococcus aureus*,²⁸ a permis de construire un nouveau modèle des deux TMDs (TMD1 et TMD2) ainsi que des deux NBDs dans une configuration « *outward facing* », c'est-à-dire ouverte sur l'espace extracellulaire (**Figure 78**).²⁹⁸

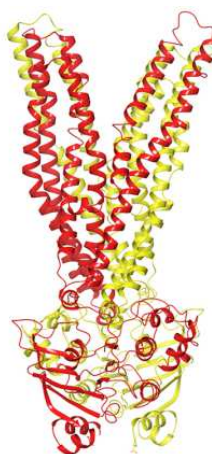


Figure 78 : Modèle par homologie 3D de MRP1 basé sur la structure de Sav1866.²⁹⁸ Les domaines TMD1-NBD1 sont représentés en rouge tandis que les domaines TMD2-NBD2 sont représentés en jaune.

La région TMD0, incluant la boucle ICL3, ne présente aucune homologie avec d'autres protéines. Ainsi, il n'est pas possible de construire un modèle par homologie de MRP1 dans sa totalité. Cependant, l'équipe de Rosenberg est parvenue en 2010 à obtenir une structure 3D de MRP1, avec une résolution de 10 Å de forme pentagonale, en conformation « *inward facing* », c'est-à-dire ouverte vers le milieu intracellulaire avec une séparation concomitante des NBDs.²⁹⁹ Cette structure est en accord avec certains modèles cristallographiques tels que celui de la P-gp.⁵⁴ L'orientation inhabituelle de l'un des NBDs au sein de MRP1 pourrait refléter la spécialisation des deux NBDs de la protéine.²⁹⁰ Cependant, il serait tout aussi possible que le NBD soit désordonné au sein du cristal.

Cette étude nous apporte également de nouvelles informations concernant TMD0. En effet, des zones de densité supplémentaires au sein de la région des TMDs pourraient correspondre à la localisation de TMD0, d'un côté de la structure principale des transporteurs ABC. La détermination exacte des segments des TMD1 et TMD2 avec lesquels interagit TMD0 n'est pas possible. Cependant, si l'on se fie au modèle de la P-gp murine, TMD0 interagirait avec les hélices transmembranaires 14, 15 et 16 de TMD2 et 7 de TMD1 (**Figure 79**). De plus, les données suggèrent que les boucles extracellulaires du TMD0 sont semblables à des coudes rapides tandis que les boucles intracellulaires sont sous la forme de densités plus larges qui pourraient correspondre à ICL3 et sous la forme de petits cylindres pour la seconde boucle cytoplasmique ICL2.

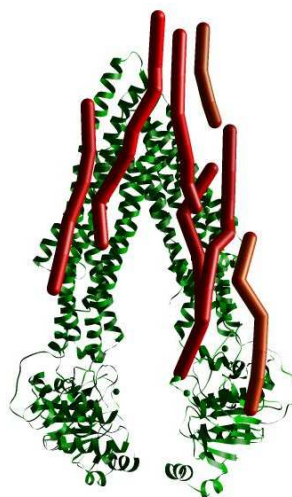


Figure 79 : Modèle de MRP1 basé sur le modèle de la structure de la P-gp murine (en vert) ainsi que l'interaction avec TMD0 (en rouge) d'après le modèle de Rosenberg.²⁹⁹

L'équipe de Ramaen est parvenue à obtenir la structure cristalline de NBD1 en complexe avec Mg^{2+} et l'ATP à 1,5 Å.³⁰⁰ Cette structure apporte un grand nombre d'informations quant au fonctionnement de NBD1 lors de l'hydrolyse de l'ATP. Tout d'abord, elle indique que NBD1 se présente sous la forme d'un monomère et possède une structure similaire aux autres transporteurs ABC. Cependant, la présence de l'ATP intact en présence de son co-facteur Mg^{2+} et la conformation inhabituelle de certains résidus clés au sein du site catalytique démontrent que NBD1 se retrouve dans une conformation non productive.

De plus, la présence d'une liaison hydrogène entre un résidu histidine de la boucle H et l'aspartate catalytique du motif Walker B oriente ces résidus en direction opposée de l'ATP, expliquant ainsi la faible activité ATPasique induite par la substitution au sein du motif Walker B du résidu Glu par le résidu Asp au niveau de NBD1 (**Figure 80**).³⁰⁰

De plus, cette liaison hydrogène semble jouer le rôle d'un interrupteur, relayant l'information de l'état d'occupation de NBD1 au site de fixation des nucléotides de NBD2. Ainsi le couple Asp/His joue un rôle central dans la coopération de l'activité ATPasique entre NBD1 et NBD2 avec la formation de l'hétérodimère.

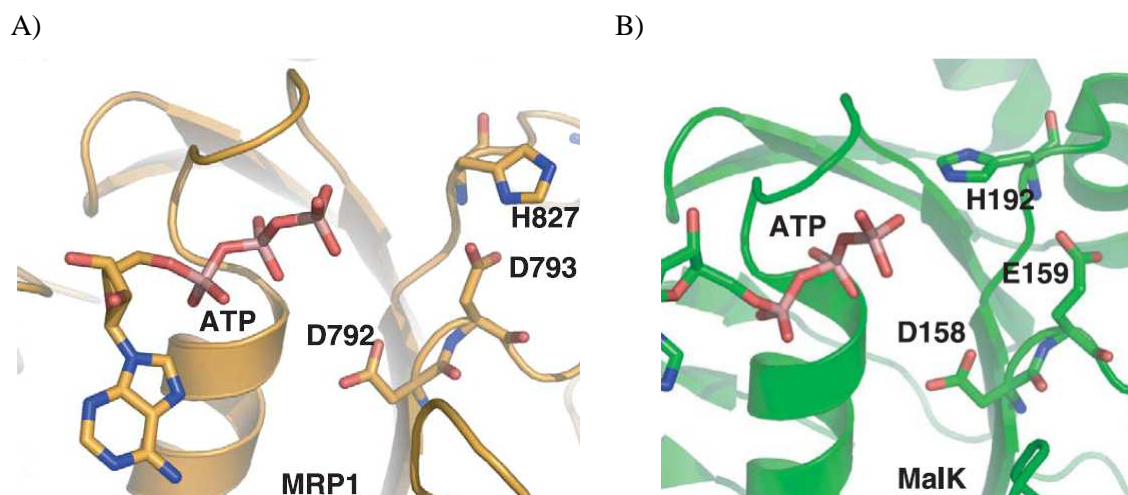


Figure 80 : Comparaison des interactions avec l'ATP des couples His/Asp-Glu chez NBD1 de MRP1 (A) et chez MalK dans une conformation liée à l'ATP (B). (Figure adaptée des travaux de Ramaen, 2006).³⁰⁰

I.1.4. Les résidus identifiés de MRP1

L'ensemble des études de mutagenèse dirigée réalisées sur les transporteurs ABC MDR est détaillé dans la base de données ABCMdb (<http://abcmutations.hegelab.org>) créée par l'équipe de Gyimesi¹²⁹ en 2012. Cette base de données rassemble ainsi les mutations affectant l'ensemble de la structure de MRP1. Parmi ces mutations, on distingue les mutants affectant l'activité générale du transporteur et ceux affectant le transport d'un ou plusieurs substrats de MRP1. Les domaines TM6, TM8-11 du TMD1 et TM14-17 du TMD2 semblent important dans la fonctionnalité et la spécificité de transport des substrats par MRP1.

Ces études ont pu incriminer quelques acides aminés importants. Par exemple, le résidu aromatique **Tyr324** issu du modèle basé sur la structure de Sav1866, localisé dans le TM6 et projeté en partie dans le chemin de translocation du substrat semble pouvoir interagir avec des substrats de MRP1.²⁹⁸ De plus, d'autres résidus, jouant un rôle important dans la spécificité et la sélectivité du substrat, ont été identifiés dans les domaines TMD1 et TMD2 d'après des études de mutagenèse, des études photo-marquées et des études de relation structure-activité ou *in silico*.^{301, 302} Il a également été démontré que la septième boucle cytoplasmique joue un

rôle important dans le passage du signal entre les domaines NBDs et les sites d'interaction des substrats au sein des TMDs.³⁰³ Des études de mutagenèses récentes ont suggéré la participation de quatre résidus chargés (Lys₅₁₃, Lys₅₁₆, Glu₅₂₁ et Glu₅₃₅), situés dans la cinquième boucle cytoplasmique, dans les interactions inter-domaines, nécessaires pour le bon repliement de la protéine.³⁰²

I.1.5. Expression de MRP1

Au sein des cellules polarisées, MRP1 est localisée de manière prédominante au sein de la membrane basolatérale³⁰⁴⁻³⁰⁷ contrairement à de nombreux autres transporteurs ABC situé au sein de la membrane apicale. Cependant, MRP1 peut également être exprimée au sein de la membrane apicale dans certaines cellules spécifiques telles que les cellules du placenta (syncytiotrophoblastes) et les cellules endothéliales des capillaires du cerveau.^{308, 309} MRP1 est également retrouvée du côté basal des cellules de Sertoli et de Leydig³¹⁰ et les cellules tubulaires proximales.³⁰⁶

MRP1 est largement exprimée au sein de divers tissus avec de haut niveau d'expression dans les poumons, les testicules, les reins, les muscles squelettiques et cardiaques, le placenta et les macrophages.^{311, 312} MRP1 est faiblement exprimée dans le foie humain adulte. Cependant, son expression augmente dans les hépatocytes en prolifération et dans les lignées cancéreuses thérapeutiques.³⁰⁴

MRP1 est également exprimée au sein des cellules gliales du cerveau *in vivo*.^{313, 314} Ainsi MRP1 pourrait jouer un rôle dans la faible pénétration dans le cerveau d'inhibiteurs de la protéase HIV ainsi que d'autres médicaments ou agents toxiques. Cependant, la fonction physiologique de MRP1 au sein de la barrière hémato-encéphalique reste floue. MRP1 est détectée du côté apical des cellules endothéliales des micro-vaisseaux du cerveau et des capillaires.^{309, 315} Cette localisation diffère de celle retrouvée généralement au niveau basolatérale dans les autres tissus ainsi que dans les cellules épithéliales polarisées. Cette différence de localisation indique ainsi l'implication éventuelle de MRP1 dans la réduction du transfert d'anions organiques dans le cerveau.^{309, 316}

I.1.6. Les substrats de MRP1

MRP1 est capable de transporter une large gamme de substrats aux structures diverses. Parmi ces substrats, de nombreuses études se sont concentrées sur le transport de xénobiotiques, impliqués dans les phénomènes de chimiorésistance et la protection de l'organisme contre des agents toxiques. MRP1 est également responsable du transport de substrats endogènes conférant à la protéine un certain nombre de fonctions physiologiques.

Le premier composé à avoir été identifié comme substrat endogène de MRP1 est l'agent pro-inflammatoire leucotriène C₄ (LTC₄) avec une très haute affinité.^{317, 318} MRP1 est également impliquée dans le transport de nombreux produits cytotoxiques naturels tels que les anthracyclines, les *vinca* alcaloïdes,^{319, 320} les anti-folates,³²¹ ou certains métaux lourds comme l'arsenic.³²²

Certains de ces composés sont transportés conjugués au glutathion (GSH, γ -L-glutamyl-L-cystéinyglycine), au glucuronide ou au sulfate, d'autres non.²⁸⁰

Ainsi MRP1 contribue à l'efflux hors des cellules d'agents hydrophobes, tels que l'antifongique carcinogène aflatoxin B1³²³ ou cationiques. Le GSH est également lui-même transporté par MRP1 ainsi que sa forme dimérique oxydée GSSG. MRP1 est impliquée dans le transport de prostaglandines,^{324, 325} de stéroïdes, de vitamines (B9 et B12) et de sels biliaires.^{326, 327} Elle possède également d'autres fonctions physiopathologiques. En effet, MRP1 est impliquée dans le transport d'antibiotiques, de plusieurs statines impliquées dans le traitement de maladies cardiovasculaires³²⁸ et de l'amyloïde- β .³²⁹

Une liste non exhaustive des substrats de MRP1 est regroupée dans le **Tableau 30**.

CHAPITRE 3. MODULATION DE LA PROTÉINE MRP1

Classes de composés		Exemples
Agents xénobiotiques non conjugués	Agents antinéoplasiques	Méthotrexate, anthracyclines (doxorubicine, daunorubicine, épirubicine, idarubicine), alcaloïdes (étoposide, vincristine, irinotécan, vinblastine), anti-androgènes (flutamide, hydroxyflutamide)
	Agents antiviraux	Saquinavir, ritonavir
	Agents antibiotiques	Difloxacin, grepafloxacin, ciprofloxacine
	Agents metalloïdes	Arsénite de sodium, arséniate de sodium
	Sondes fluorescentes	Calcéine, Fluo-3, BCECF, SNARF
Agents xénobiotiques conjugués	Agents glutathioconjugués	2,4-Dinitrophenyl-SG, biman-SG, N-ethylmaleimide-SG, doxorubicin-SG, thiotepa-SG, cyclophosphamide-SG, melphalan-SG, chlorambucil-SG, acide éthacrynique-SG, metolachlor-SG, atrazine-SG, sulforaphane-SG, aflatoxin B1-epoxide-SG, 4-nitroquinoline 1-oxide-SG, As(SG) ₃
	Agents glucoronoconjugués	Etoposide-Gluc, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL)-3b-OGluc, SN-38-gluc, 4-methylumbelliferyl-D-gluc, 6-hydroxy-5,7-dimethyl-2-methylamino-4-(3-pyridylmethyl) benzothiazole sulfate (E3040S)-Gluc
Métabolites naturels	Glutathioconjugués	Leukotriene C ₄ , prostaglandin A ₂ -SG, 15-deoxy-D _{12,14} prostaglandin J ₂ -SG, hydroxynonenal-SG
	Sulfatoconjugués	Estrone 3-sulfate, dehydroepiandrosterone sulfate, sulfatolithocholate
	Non conjugués	Acide folique, L-leucovorine, GSH, GSSG, vitamine B ₁₂

Tableau 30 : Substrats endogènes et exogènes connues de MRP1.

I.1.7. Les modes de transport de MRP1

Il existe plusieurs mécanismes potentiels de transport des substrats par MRP1, conjugués ou non :

- le transport ne nécessite aucune conjugaison. C'est le cas par exemple du méthotrexate (**Figure 81A**) ;
- le transport nécessite une conjugaison au GSH (LTC₄), au glucuronide (E₂17βG) ou au sulfate (**Figure 81B**) ;

CHAPITRE 3. MODULATION DE LA PROTÉINE MRP1

- le GSH stimule le transport de certains substrats sans être transporté lui-même. C'est le cas de l'estrone-3-sulfate (**Figure 81C**) ;³³⁰
- le GSH est co-transporté avec le substrat : le transport de certains composés est accru en présence de GSH. (**Figure 81D**) ;^{318, 320, 323, 331}
- le transport du GSH peut être stimulé par certains composés non transportés tels que le vérapamil ou l'apigénine (**Figure 81E**).^{332, 333}

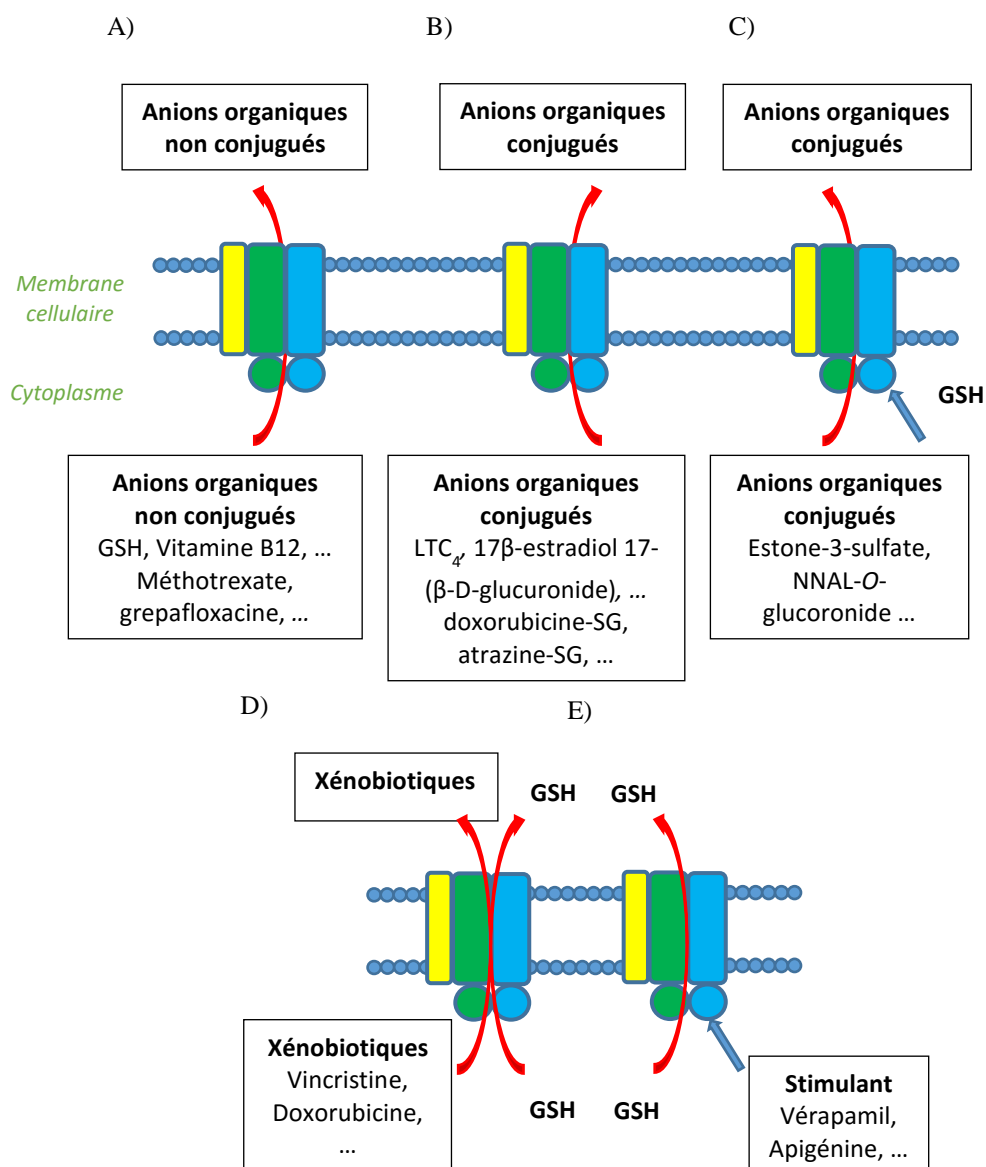


Figure 81 : Représentation schématique des modes de transport de différents substrats de MRP1, adaptée des travaux de Cole.³³⁴ A) Transport d'anions organiques non conjugués. B) Transport d'anions organiques conjugués au GSH, au glucuronide ou au sulfate. C) Stimulation du transport par le GSH sans que celui-ci ne soit transporté. D) Co-transport de xénobiotiques et de GSH. E) Modulateurs stimulant l'efflux de GSH.

Le GSH est également lui-même un substrat de MRP1 tout comme le GSSG. Le transport du GSH reste faible en l'absence d'autres substrats³³¹ à l'inverse de celui du GSSG.³³⁵ Le GSSG tend à s'accumuler dans les cellules en conditions de stress oxydant. En raison de ses activités pro-oxydantes, le ratio GSSG/GSH doit donc être maintenu à son minimum afin d'assurer un fonctionnement normal des cellules. Ceci peut être réalisé par réduction du GSSG en GSH par l'enzyme GSH réductase mais également par l'efflux de GSSG *via* MRP1. La protéine MRP1 contribue au maintien du potentiel redox des cellules et leur permet donc de lutter contre le stress oxydant.

I.1.8. Cycle de transport de MRP1

La protéine MRP1 partage quelques étapes communes avec le modèle « *switch* » des transporteurs ABC,⁵⁸ mais les étapes de fixation et de l'hydrolyse de l'ATP diffèrent. Les différentes étapes du cycle de transport sont (**Figure 82**) :³¹¹

- *étape 1* : à l'état de repos, le transporteur est dans une forme dépourvue d'ATP et présente une forte affinité pour le substrat (ou le GSH ou le substrat glutathioconjugué). La fixation du substrat (le LTC₄ dans la **Figure 82**) au TMDs induit un changement de conformation des NBDs favorisant l'interaction entre l'ATP et NBD1 ;
- *étape 2* : la liaison entre l'ATP et NBD1 stabilise l'interaction entre les NBDs et facilite la liaison avec une seconde molécule d'ATP ;
- *étape 3* : la liaison avec la seconde molécule d'ATP complète la formation du dimère fermé de NBDs et induit ensuite un changement conformationnel du NBD2. L'ensemble de ces changements altère l'affinité du substrat et permet sa libération ;
- *étape 4* : suite à l'hydrolyse de l'ATP au site NBD2, la protéine se maintient dans une conformation de faible affinité tant que NBD1 est occupé par de l'ATP et que l'ADP n'a pas été libéré par NBD2. Bien que l'étape conduisant à la conformation de faible affinité soit largement décrite, la manière dont la protéine retrouve sa forme initiale reste encore hypothétique et des questions subsistent sur le fonctionnement exacte de NBD1 : est-il un site catalytique ou non ? En effet si NBD1 n'exerce plus d'activité ATPasique, le retour en position initiale de la protéine nécessite la libération d'ADP au niveau de NBD2 et d'ATP au niveau de NBD1 (*étape 5*). Mais on ne peut exclure l'hypothèse que l'hydrolyse de l'ATP par NBD1 soit nécessaire pour réinitialiser la protéine (*étape 6*).

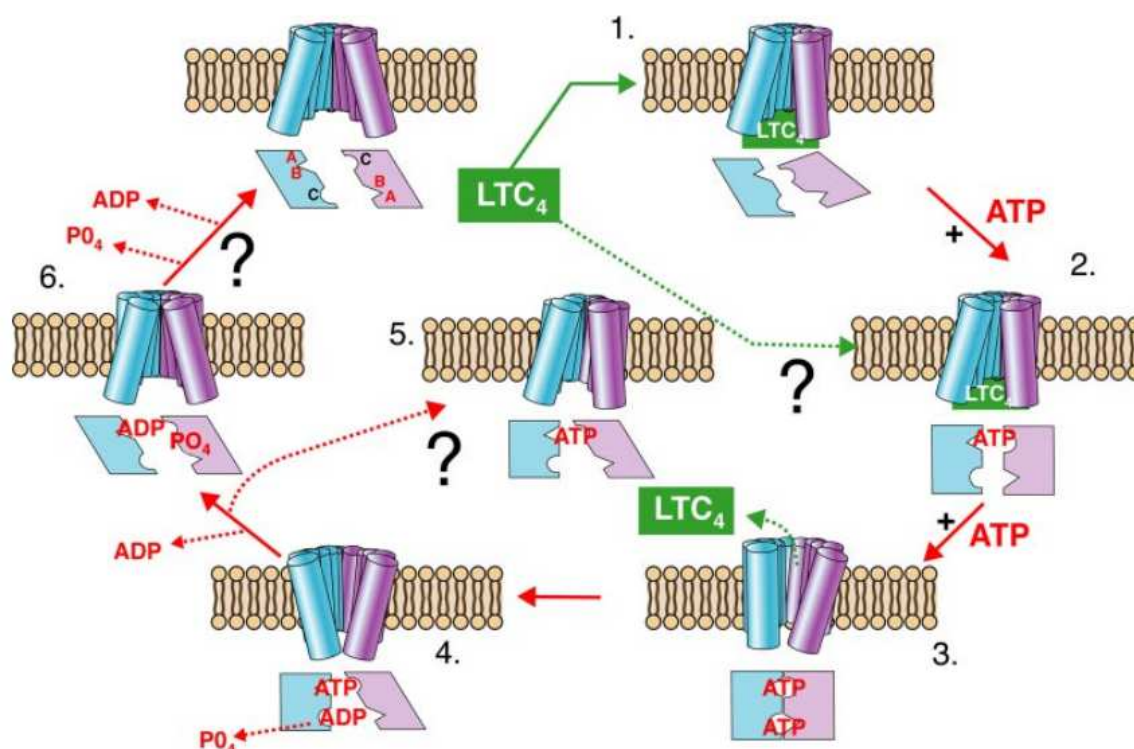


Figure 82 : Modèle du cycle hypothétique du transport du LTC₄ par MRP1. MSD0 n'est pas représenté sur ce modèle car il n'intervient pas dans le transport de certains substrats tels que le LTC₄.³¹¹

I.1.9. L'activité ATPasique de MRP1

Les activités ATPasiques reportées pour différents transporteurs ABC peuvent être très variables, allant d'une activité très faible telle que 50 nmol.min⁻¹.mg⁻¹ pour CFTR³³⁶ à très élevée telle que 1 µmol.min⁻¹.mg⁻¹ pour la P-gp.³³⁷ Après purification de MRP1 native et reconstitution de la protéine en protéoliposomes, MRP1 présente une activité ATPasique plus faible que celle de la P-gp, avec une valeur d'environ 5-10 nmol.min⁻¹.mg⁻¹.³³⁸ En comparaison à la P-gp, l'activité ATPasique de MRP1 présente une V_{max} bien plus faible mais une affinité pour l'ATP bien supérieure (K_m (MRP1) = 100-300 µM contre K_m (P-gp) = 940 µM).³³⁹ Certains substrats de MRP1 (GSH, LTC₄, doxorubicine) ainsi que certains modulateurs (flavonoïdes et vérapamil)^{338, 340-343} sont capables de stimuler l'activité ATPasique de MRP1.

Comme nous l'avons vu précédemment, les deux domaines NBDs de MRP1 ne sont pas équivalents. En effet, plusieurs différences structurales démontrent que l'affinité de NBD1

pour l'ATP est deux à trois fois supérieure à celle du NBD2, ce dernier étant le site d'hydrolyse de l'ATP. Des résultats de modélisation moléculaire du dimère NBD1/NBD2 combiné à des simulations de dynamique moléculaire suggèrent que NBD1 est capable d'hydrolyser l'ATP avec une très faible efficacité et que le taux de largage de l'ADP par NBD1 pourrait être l'étape limitante du cycle de transport de MRP1.³⁴⁴

I.1.10. Les rôles physiologiques de MRP1

La diversité des substrats transportés ainsi que son expression étendue au sein de l'organisme suggèrent différents rôles physiologiques joués par MRP1. L'un des substrats les plus transporté par la protéine est le LCT₄. Les cystéinyls leucotriènes (LTC₄ mais également LTD₄ et LTE₄ issus de la conversion de LTC₄) sont impliqués dans un grand nombre de pathologies telles que les réactions inflammatoires et anaphylactiques, l'asthme, les réactions allergiques, l'hypertension et les crises cardiaques.³⁴⁵⁻³⁵¹

La présence de MRP1 au sein des barrières hématologiques placentaires, cérébrales et testiculaires indique un rôle de protection des sites vitaux de l'organisme par le transporteur. En effet, il a été observé chez les souris *mrp1*^{-/-} une augmentation du passage de substrats de MRP1 du sang vers le liquide cébrospinal. Au sein du placenta, MRP1 serait capable de protéger le fœtus des xénobiotiques et permettrait la prévention de l'accumulation fœtale d'endobiotiques tels que E₂17βG.^{307, 308} Pour finir, l'efflux d'estrone sulfate par les cellules de Leydig permettrait d'aider les testicules à se protéger des effets féminisants de l'estrogène.³³⁰

Du fait de son implication dans le transport du GSH et du GSSG, MRP1 permettrait également de maintenir le potentiel redox des cellules.^{352, 353} En effet, MRP1 protégerait les astrocytes de rats contre une exposition au H₂O₂³⁵³ et serait impliqué dans le transport de substrats produits lors des périodes de stress oxydatif tels que le 4-hydroxynonenal-GS, composé toxique issu de la peroxidation lipidique.³⁵⁴

I.2. IMPLICATION DE MRP1 DANS LA CHIMIORÉSISTANCE

Comme nous l'avons vu précédemment, MRP1 est capable de transporter de nombreux agents antinéoplasiques hydrophobes et hydrophiles, réduisant leur concentration cellulaire et donc leur efficacité conduisant les cellules tumorales à devenir résistantes.³⁵⁵⁻³⁵⁷ Un grand nombre de ces agents anticancéreux sont transportés uniquement par MRP1 et souvent en présence de GSH, une propriété que ne possède pas la protéine P-gp.³³² Ainsi, la présence de GSH au sein des cellules de l'organisme augmente considérablement le spectre des substrats transportés par MRP1.

Cependant, il reste difficile de définir précisément l'implication de MRP1 dans le phénotype de chimiorésistance en raison de certaines limitations expérimentales et ceci malgré le nombre d'études portant sur ce sujet.

Des niveaux élevés de MRP1 ont été détectés dans une large variété de tumeurs solides. Ces études suggèrent que la diminution de l'activité ou l'inhibition de la protéine pourrait avoir des effets bénéfiques sur certains patients.³¹¹ Les leucémies myéloïdes aigües et les leucémies lymphoblastiques aigües font parties des tumeurs hématologiques pour lesquelles MRP1 semble être fortement impliquée dans l'échec du traitement.³⁵⁸ Une résistance due à la surexpression de MRP1 est observée pour des tumeurs solides telles que le cancer du poumon non à petites cellules, le cancer de la prostate ou certains cancers du sein.³¹¹ L'un des cas où l'importance de MRP1 d'un point de vue clinique est incontestable est son implication dans le neuroblastome, une tumeur maligne solide extra-cérébrale, la plus fréquente chez le jeune enfant. MRP1 constitue ainsi un indicateur puissant et une cible de choix dans le traitement de cette maladie.^{359, 360}

MRP1 joue ainsi un rôle non négligeable dans la chimiorésistance et la modulation de cette protéine constitue l'une des stratégies les plus utilisées afin de palier au phénotype MDR.

I.2.1. Inhibition de la protéine MRP1

L'émergence de résistance des cellules tumorales face aux traitements par chimiothérapie et la corrélation de cette résistance à la surexpression de protéines membranaires telles que MRP1 a conduit au développement de nouveaux agents capables d'inhiber ces protéines. Alors que

plusieurs inhibiteurs de la P-gp ont atteint les tests cliniques, peu d'inhibiteurs spécifiques à MRP1 se sont révélés aussi efficaces.

Les structures et fonctionnalités de la P-gp et de MRP1 étant similaires, un grand nombre de modulateurs de la P-gp ont été criblés sur MRP1. Cependant, un grand nombre de ces modulateurs se sont révélés inactifs pour MRP1. Le fait que les substrats de la P-gp soient des molécules hydrophobes et que MRP1 ne reconnaisse que des substrats hydrophiles peuvent expliquer cet échec. L'exception est le dérivé quinoline MS-209, capable d'inhiber les deux protéines.³⁶¹ D'autres inhibiteurs ont été mis au point afin de contrecarrer le phénotype MDR dû à la surexpression de MRP1. L'agostérol A, un stérol polyhydroxylé naturel ainsi que certains de ses dérivés en font partis (**Figure 83**).^{362, 363}

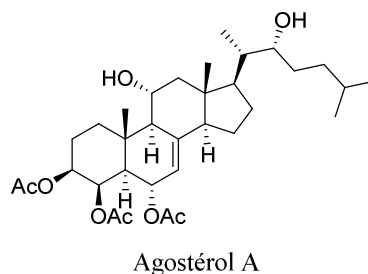


Figure 83 : Structure de l'agostérol A.

Le vérapamil, un inhibiteur calcique, est considéré comme un inhibiteur de référence de la P-gp. Cependant, le vérapamil seul ne parvient pas à restaurer la sensibilité des cellules chimiorésistantes surexprimant MRP1. Alors que le vérapamil seul inhibe très faiblement le transport du LTC₄ *via* MRP1, son association au GSH augmente par 20 fois l'inhibition de la protéine.³¹⁸ Des études de relations structure-activité portant sur des dérivés du vérapamil contenant un cycle dithiane conduisent, en présence de GSH, à des inhibiteurs efficaces du transport du LTC₄.³⁶⁴

Les flavonoïdes, tels que la génistéine³⁶⁵ ou le flavopiridol³²¹ constituent également de bons inhibiteurs de MRP1. Les effets variables observés ainsi que la nécessité de la présence de GSH dans certains cas suggèrent la présence de plusieurs sites d'interaction.³⁴¹ Les flavones (lutéoline, apigénine) et les flavonols (quercétine, kaempferol, myricétine) se sont révélées être plus efficaces que les isoflavones (génistéine)³⁶⁵ et les flavanones (naringénine, taxifoline) (**Figure 84**). La déshydrosilybine constitue également un inhibiteur de choix de MRP1 capable d'interagir au niveau de plusieurs sites d'interaction avec la protéine (**Figure 84**).³⁶⁶

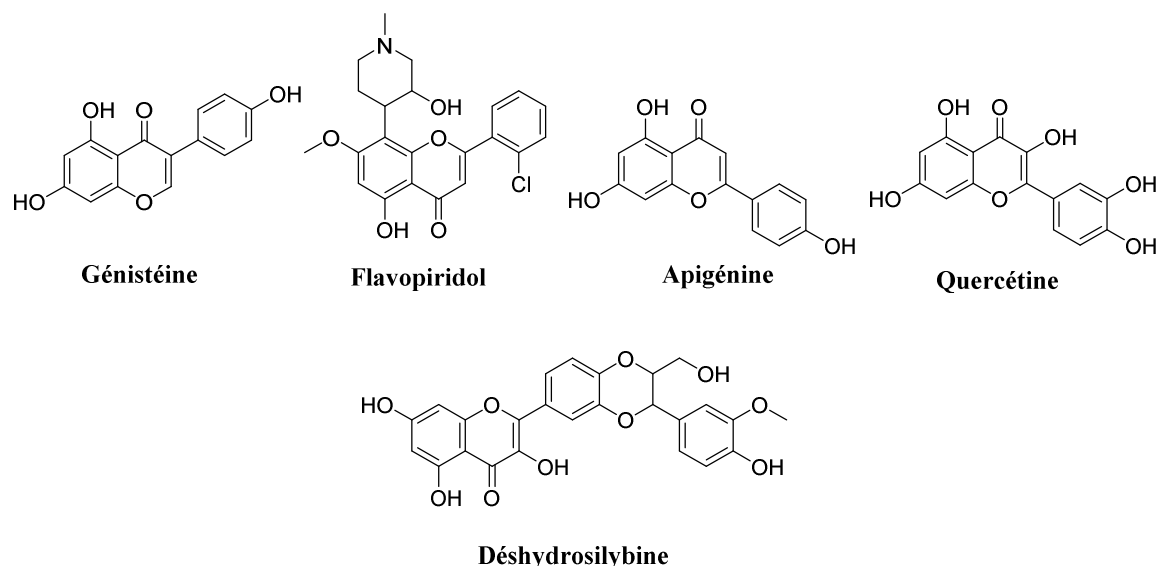


Figure 84 : Structures de quelques flavonoïdes, inhibiteurs connus de MRP1.

La conception de nouveaux inhibiteurs à partir de la structure du raloxifène, utilisé dans le cadre de traitements hormonaux de substitution, a conduit à la découverte de nouveaux analogues présentant des activités inhibitrices *in vitro* et *in vivo* (**Figure 85**).^{367, 368}

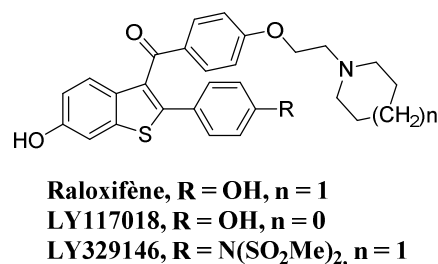


Figure 85 : Le raloxifène et ses analogues.

Le probénécide, utilisé couramment pour sa capacité à abaisser la concentration de l'acide urique dans le sang, se révèle être un inhibiteur du transport du LTC₄ mais également être capable de sensibiliser à nouveau des cellules chimiorésistances surexprimant MRP1 tout en n'étant pas actif sur la P-gp *in vitro* (**Figure 86**).³⁶⁹

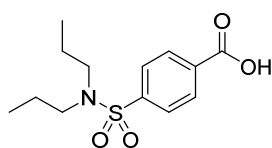


Figure 86 : Structure du probénécide.

CHAPITRE 3. MODULATION DE LA PROTÉINE MRP1

De plus, des analogues d'indolopyrimidines et de pyrrolopyrimidines^{370, 371} ont également présenté une activité inhibitrice de l'activité de transport de MRP1 (**Figure 87**).

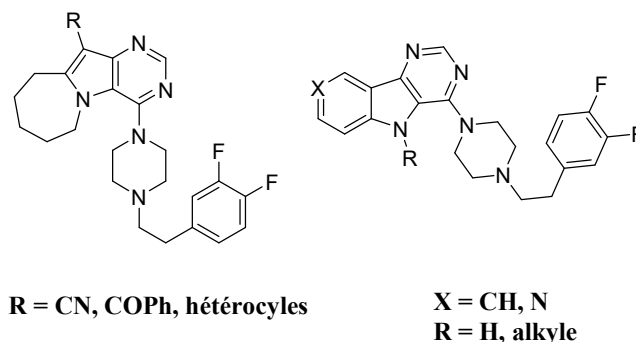


Figure 87 : Pyrrolopyrimidines et indolopyrimidines comme inhibiteurs de MRP1.

L'indométhacine, un agent anti-inflammatoire, est également capable de sensibiliser des cellules surexprimant MRP1 à la vincristine et à l'étoposide (**Figure 88**).³⁷²

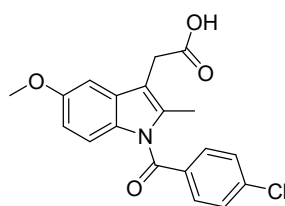


Figure 88 : Structure de l'indométhacine.

D'autres analogues, conçus comme antagonistes du récepteur au leukotriène, se sont également révélés moduler MRP1. Parmi ces composés, on peut citer MK571 et ONO-1078 (**Figure 89**).³⁷³

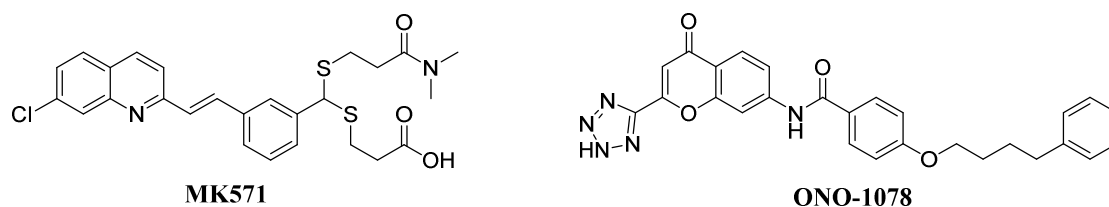


Figure 89 : Structures des inhibiteurs MK571 et ONO-1078.

Des pipérazines *N,N*-disubstituées ainsi que des pipéridylfluorendione nitrogénées ont été mises au point comme inhibiteurs doubles agissant sur la P-gp et sur MRP1 (**Figure 90**).³⁷⁴⁻³⁷⁶

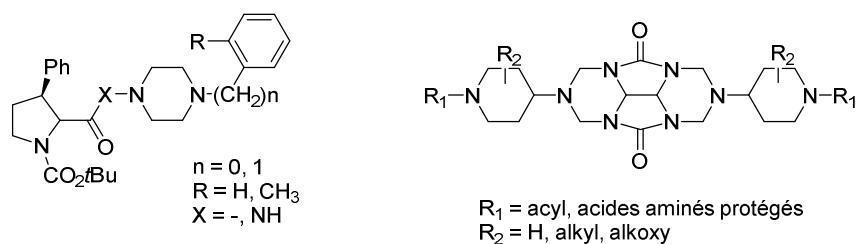


Figure 90 : Dérivés de pipérazines et pipéridines, inhibiteurs doubles de la P-gp et de MRP1.

Par la suite, un analogue possédant un cycle isoxazole, le LY402913³⁷⁷ ainsi qu'un dérivé quinoxalinone se sont révélés être des inhibiteurs actifs et sélectifs de MRP1 par rapport à la P-gp.^{375, 378} Il en est de même pour le dérivé quinoléinique issu des structures de MS-209 et de LY335979, inhibiteurs de référence de la P-gp (**Figure 91**).³⁷⁹

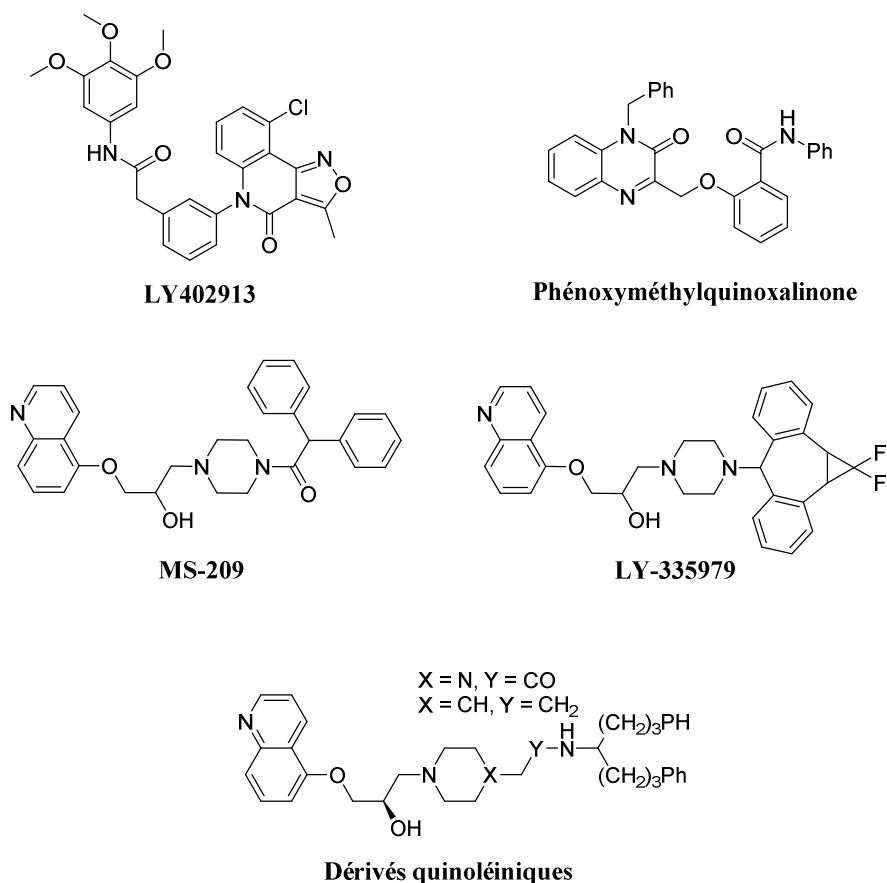


Figure 91 : Structures dérivées d'isoxalone et de quinoxalinone comme inhibiteurs sélectifs de MRP1 par rapport à la P-gp.

Certains composés sont transportés *via* MRP1 sous forme conjuguée avec le GSH ou *via* un co-transport avec le GSH (aucune liaison covalente entre le substrat et le GSH). La formation de substrats glutathioconjugués est catalysée par l'enzyme glutathion-S-transférase (GST).

CHAPITRE 3. MODULATION DE LA PROTÉINE MRP1

Ainsi la surexpression de GST est associée à la résistance de certains agents thérapeutiques. Des inhibiteurs de l'enzyme GST ont été conçus et deux types de modulateurs de MRP1 ont été étudiés : les composés capables d'imiter le GSH et des composés glutathioconjugués. Parmi ces composés on retrouve le TER199, un compétiteur des substrats et analogue du GSH.³⁸⁰ Parmi les analogues glutathioconjugués, un inhibiteur de la GST conjugué au GSH et à l'acide éthacrynique s'est révélé être un inhibiteur compétitif de MRP1 (**Figure 92**).³⁸¹ La P-gp ne nécessitant pas de GSH pour assurer sa fonction de transport, les composés glutathioconjugués ou analogues du GSH tendent ainsi à être sélectifs à MRP1. Malheureusement leur interférence avec le rôle physiologique du GSH peut poser quelques problèmes en termes de toxicité.

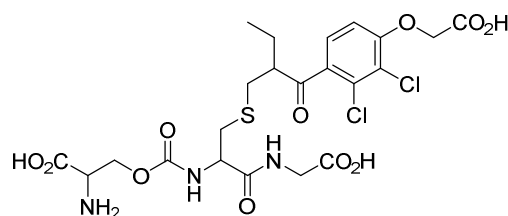


Figure 92 : Structure d'un inhibiteur de la GST conjugué au GSH et à l'acide éthacrynique.

La pertinence associée aux composés peptidiques comme inhibiteurs de MRP1 a été confirmée ensuite par un peptide cyclique naturel, le dendroamide A, capable de restaurer la sensibilité à la vincristine d'une lignée cellulaire surexprimant MRP1 (**Figure 93**).^{382, 383}

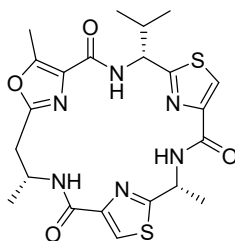


Figure 93 : Structure de la dendroamide A.

Des études plus récentes portent sur la structure de dérivés galloyls comme inhibiteurs de MRP1 et de la P-gp (**Figure 94**). De faibles modifications structurales permettent de moduler la sélectivité pour l'un ou l'autre inhibiteur.³⁸⁴

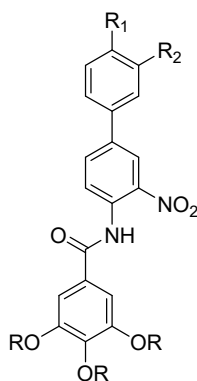


Figure 94 : Structure générale des dérivés galloyls comme inhibiteurs de la P-gp et MRP1.

I.2.2. MRP1 et la sensibilité collatérale

I.2.2.1 Généralités

De nombreux efforts ont été entrepris dans la recherche de nouveaux modulateurs des transporteurs ABC afin de contrecarrer la chimiorésistance. Bien que de nombreux composés se soient révélés efficaces *in vitro*, leurs études cliniques ont conduit à de nombreux échecs. L'ensemble de ces résultats a incité les scientifiques à orienter leurs recherches vers de nouvelles stratégies alternatives.

L'une d'entre elles a récemment vu le jour : le développement d'une hypersensibilité des cellules cancéreuses chimiorésistantes. En effet, il a été mis en évidence qu'en présence de certains composés, les cellules cancéreuses surexprimant MRP1 meurent par apoptose alors que les cellules saines ne sont pas affectées. Ce nouveau profil pharmacologique se nomme **sensibilité collatérale**.¹¹² Il devient alors possible de mettre au point de nouveaux composés capables de cibler sélectivement les cellules cancéreuses surexprimant un transporteur ABC. Cette nouvelle stratégie thérapeutique présente ainsi l'avantage d'éviter les effets secondaires sur les cellules saines dus à l'action des agents anticancéreux. Cependant le mécanisme de ce nouveau profil pharmacologique reste encore mal connu.^{385, 386}

Dans le cas du phénotype MDR, le premier cas de sensibilité collatérale a été observé en 1976 pour des cellules CHO pour lesquelles le degré de sensibilité collatérale semble être corrélé au degré de résistance des cellules cancéreuses à la colchicine et donc au taux d'expression de la

P-gp.³⁸⁷ La sensibilité collatérale liée à la surexpression de MRP1 est l'une des plus étudiées et semble liée au transport du glutathion.

I.2.2.2 *Le glutathion, acteur principal de la sensibilité collatérale chez MRP1*

Le glutathion (GSH) est un tripeptide formé par la condensation d'acide glutamique, de cystéine et de glycine (**Figure 95**). Grâce à la présence d'une fonction thiol, ce composé intervient dans le maintien du potentiel redox des cellules, leur permettant de se protéger contre le stress oxydatif. Présent en forte concentration au sein de l'ensemble des cellules, le GSH intervient dans un grand nombre de processus biochimiques tels que la prolifération cellulaire, la réponse immunitaire ou l'apoptose.

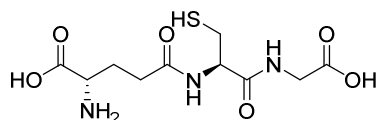


Figure 95 : Structure du glutathion (GSH).

Le glutathion existe sous forme réduite (GSH) et sous forme oxydée (GSSG), cette dernière étant moins abondante que la première. Le rapport entre ces deux formes permet de connaître l'état redox de la cellule. L'équilibre entre les formes oxydée et réduite est également assuré par l'action d'enzymes telles que la Glutathion réductase qui permet la réduction de GSSG en GSH. Une autre enzyme importante, la Glutathion-S-transférase (GST) permet au GSH de se conjuguer à certains xénobiotiques *via* le groupement thiol et confère ainsi au glutathion un rôle important dans la détoxification cellulaire.

Grâce aux autres enzymes présentes (γ -Glutamylcystéine synthétase et la Glutathion synthétase), la synthèse du glutathion est autorégulée. En effet, si le glutathion est en quantité suffisante au sein de la cellule, la synthèse s'arrête. Au contraire, si la concentration intracellulaire en glutathion devient trop faible, la synthèse redémarre. Le glutathion peut également être efflué hors de la cellule, sous sa forme oxydée, conjuguée ou non, permettant ainsi de réguler sa concentration intracellulaire.

D'après certaines études, les cellules cancéreuses sembleraient contenir davantage de glutathion que les cellules saines,³⁸⁸ leur permettant ainsi, par exemple, de se protéger contre

l'apoptose. La stratégie selon laquelle un appauvrissement des cellules tumorales en glutathion permettrait de les rendre plus sensibles à l'apoptose serait ainsi envisageable et est d'ores et déjà étudiée par de nombreuses équipes (**Figure 96**).³⁸⁹⁻³⁹³

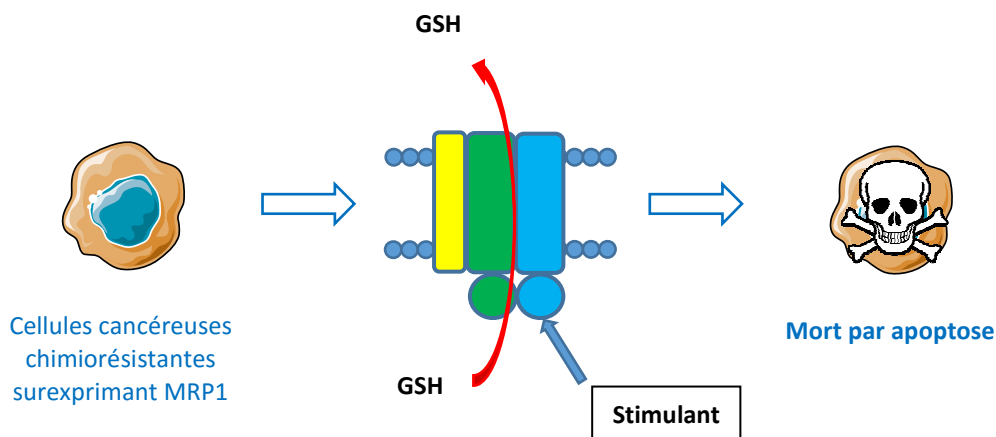


Figure 96 : Schéma du mécanisme de sensibilité collatérale chez MRP1.

Cette approche thérapeutique aurait pour effet d'éviter la métabolisation des médicaments et donc de potentialiser leurs effets, de favoriser l'attaque des agents oxydants (ROS, RNS) et d'initier l'apoptose.

1.2.2.3 Le vérapamil, inducteur de la sensibilité collatérale via par MRP1

Comme nous l'avons vu précédemment, MRP1 est capable de transporter le glutathion, ainsi que ses conjugués, exogènes ou endogènes. En 1986, il a été observé que le vérapamil (**Figure 97**), inhibiteur calcique et inhibiteur de référence de la protéine P-gp,³⁹⁴ est capable d'induire une sensibilité collatérale au sein de cellules H69 surexprimant MRP1.³⁹⁵

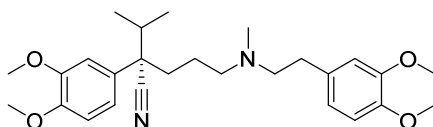


Figure 97 : Structure du Vérapamil.

Bien qu'inefficace dans la restauration de la sensibilité aux agents anticancéreux des cellules chimiorésistantes surexprimant MRP1,³⁹⁶ plusieurs études ont démontré, dans les années

2000, la capacité du Vérapamil à transporter activement le glutathion, pouvant ainsi moduler la résistance liée à MRP1.^{397, 398} Les travaux de Loe confirment l'hypothèse selon laquelle la capacité du vérapamil à moduler la résistance attribuée à MRP1 n'est pas liée à sa faculté d'inhiber directement la protéine mais à son effet sur l'efflux du GSH.³⁹⁸ En 2004, il a été observé que MRP1, surexprimée au sein des cellules BHK21, transporte massivement le glutathion induisant une sensibilité collatérale en présence de vérapamil (**Figure 98**).³⁹¹ L'un des mécanismes proposés serait une symbiose entre une augmentation du stress oxydatif et la déplétion intracellulaire en glutathion empêchant toute protection.³⁸⁵

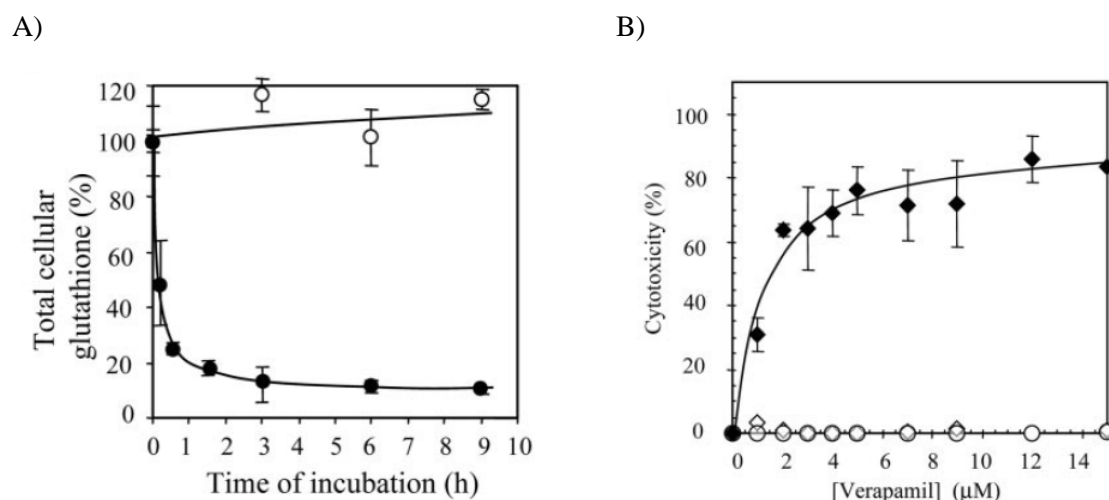


Figure 98 : (A) Efflux du glutathion par MRP1 induit par 10 µM de vérapamil et (B) sensibilité collatérale observée sur les lignées cellulaires BHK-21 contrôles (○) et les lignées cellulaires transfectées surexprimant MRP1 (BHK-21-MRP1) (●).

L'analogue iodé du vérapamil présente également un effet apoptotique important, issu de l'efflux massif de GSH *via* MRP1 (**Figure 99**).³⁹⁹

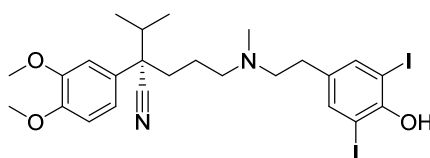


Figure 99 : Structure du dérivé iodé du vérapamil.

Possédant un centre asymétrique, il a été démontré que les deux énantiomères du vérapamil ne présentent pas les mêmes effets sur l'activité de MRP1. Seul l'énantiomère *S* est capable d'induire l'apoptose par un efflux massif de GSH chez les cellules chimiorésistantes

surexprimant MRP1. L'efflux de GSH induit par l'isomère *S*, et non observé chez l'énantiomère *R* est supérieur à celui obtenu par le mélange racémique. Au contraire, l'énantiomère *R* sensibilise à nouveau les cellules chimiorésistantes à la vincristine par inhibition de la protéine MRP1.⁴⁰⁰

Cependant, le vérapamil et son dérivé sont fortement cardiotoxiques aux concentrations utilisées pour le traitement du phénotype MDR. C'est pour cette raison que d'autres familles de molécules ont été étudiées afin de trouver de nouveaux composés présentant le profil de sensibilité collatérale tout en étant le moins toxiques possible.

1.2.2.4 Les flavonoïdes comme nouveaux inducteurs de sensibilité collatérale

Par la suite, d'autres travaux ont démontré que les flavonoïdes étaient une famille intéressante pour la sensibilité collatérale. Les flavonoïdes sont des dérivés naturels qui présentent des activités pro- et anti-oxydantes. Cette famille de molécules est largement reconnue dans la prévention pour le cancer ainsi qu'en chimiothérapie.⁴⁰¹ Parmi ces flavonoïdes, l'apigénine (**Figure 100**) a été identifiée comme un agent cytotoxique sélectif des cellules chimiorésistantes surexprimant MRP1 telles que les cellules sélectionnées H69AR et les cellules transfectées HeLa.^{341, 402}

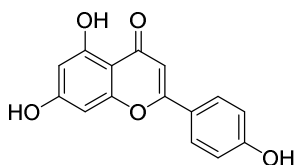


Figure 100 : Structure de l'apigénine.

De plus, il a été démontré que certains flavonoïdes, tels que l'apigénine, la naringénine, la génistéine et la quercétine, sont capables d'induire une stimulation du transport de GSH *via* MRP1.³³³

Guidés par ces résultats, nos collaborateurs biologistes de l'IBCP de Lyon ont criblé un grand nombre de flavonoïdes, tels que des flavones et des flavonols afin de trouver de nouveaux composés présentant le profil de sensibilité collatérale et dépourvus de toxicité.⁴⁰³ L'ensemble de ces composés a été testé pour leur induction d'efflux de GSH à 20 μ M, leur cytotoxicité sur des cellules chimiorésistantes surexprimant MRP1 (H69AR) et des cellules parentales sensibles (NCI-H69). Dans chaque cas est déterminé le rapport de sélectivité (noté RS), ratio

CHAPITRE 3. MODULATION DE LA PROTÉINE MRP1

de l'EC₅₀ obtenue sur les cellules parentales sur l'EC₅₀ obtenue sur les cellules surexprimant MRP1. Cette valeur de RS représente la sensibilité collatérale (**Tableau 31**).

Composés	% Efflux net GSH à 20μM	EC ₅₀ (μM) H69AR	EC ₅₀ (μM) NCI-H69	RS
Vérapamil SR	96,8	7 ± 5	>100	>14,8
Apigénine	43,0	10 ± 5	>100	>10
Chrysine	76,5	5 ± 4	>100	>20,4
3-Méthoxychrysine	65,6	4 ± 3	>100	>24,5
5,7-Dihydroxy-4'-fluoroflavone	74,5	5 ± 3	>100	>20,5

Tableau 31 : Résultats biologiques obtenus pour les meilleurs flavonoïdes, inducteurs de sensibilité collatérale. Activité d'efflux de GSH sur les cellules BHK-21 exprimée en % d'efflux net de GSH (différence entre le pourcentage d'efflux de GSH dans les cellules sensibles BHK-21 contrôle et le pourcentage d'efflux dans les cellules résistantes BHK-21 surexprimant MRP1) et cytotoxicité des composés sur les cellules H69AR surexprimant MRP1 et les cellules contrôles NCI-H69. Les valeurs des EC₅₀ ont été calculées à partir de courbes doses-réponses. RS est le rapport de sélectivité. Les valeurs représentent la moyenne ± la déviation standard sur un minimum de trois expériences indépendantes.

Parmi les meilleurs composés issus de cette étude, on retiendra la chrysine, un flavonoïde naturel ainsi que deux analogues synthétiques, la 3-méthoxychrysine et la 5,7-dihydroxy-4'-fluoroflavone (**Figure 101**).

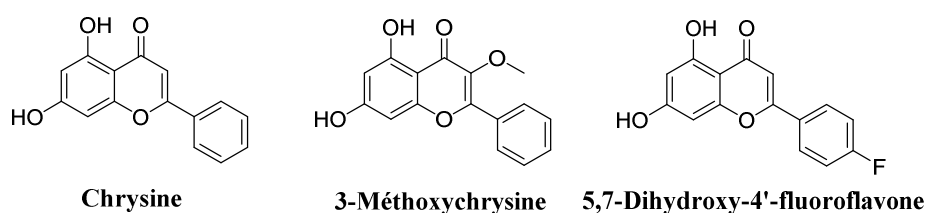


Figure 101 : Structures présentant un profil de sensibilité collatérale.

Cependant, il a été observé que certains flavonoïdes, capables d'induire un efflux massif de GSH, ne parvenaient pas à induire une mort sélective par apoptose des cellules chimiorésistantes surexprimant MRP1. Ceci fut également observé lors de l'étude du comportement des xanthones vis-à-vis de la sensibilité collatérale⁴⁰⁴ montrant ainsi que la mort sélective par apoptose des cellules chimiorésistantes surexprimant MRP1 ne dépend pas uniquement de l'efflux de GSH. Ainsi, il existerait différentes cibles biologiques, la première étant MRP1 et conduisant à un efflux massif de GSH hors des cellules, tandis que d'autres cibles conduiraient à la mort sélective par apoptose uniquement si les cellules sont amoindries

de leur teneur en GSH. L'implication d'autres voies cellulaires dans l'induction de l'apoptose est une hypothèse qui doit encore être explorée.

Cependant, certaines caractéristiques structurales, issues d'études de relations structure-activité, favorisent la sensibilité collatérale. En effet, l'absence de groupement hydroxyle en position 3 de la flavone est une condition nécessaire afin de conserver l'effet apoptotique des composés.⁴⁰³ Ainsi les flavonoïdes représentent une famille de choix pour la recherche de nouveaux agents anticancéreux induisant sélectivement l'apoptose des cellules chimiorésistantes surexprimant MRP1.

II. Travaux personnels : conception, synthèse et évaluation biologique de nouveaux modulateurs de MRP1 ciblant la sensibilité collatérale

II.1. OBJECTIFS DES TRAVAUX PERSONNELS

Suite aux résultats encourageants obtenus pour les flavonoïdes, l'objectif de cette thèse a été de continuer cette investigation par la conception, la synthèse et l'évaluation biologique de nouveaux ligands de MRP1, dépourvus de toxicité, destinés à agir comme activateurs de MRP1 pour induire l'efflux du glutathion (GSH) aboutissant à terme à la mort cellulaire par apoptose.

II.2. CHOIX DES MOLÉCULES CIBLES

Les flavonoïdes constituent une famille de composés de choix pour le développement de nouveaux modulateurs de la protéine MRP1 dans le cadre du phénotype MDR. En effet, on retrouve un grand nombre de ces composés quasiment non cytotoxiques dans notre alimentation.

De plus, comme nous l'avons vu précédemment, de nombreuses études ont déjà souligné l'implication des flavonoïdes, et en particulier des flavones, dans la modulation des différents transporteurs ABC responsables du phénotype MDR,^{375, 405, 406} conduisant à un premier travail de prospection, entrepris antérieurement au sein du laboratoire. Cette première étude a permis d'apporter de nouvelles informations quant aux relations structure-activité liées à MRP1 et a ainsi été poursuivie dans le cadre de cette thèse.

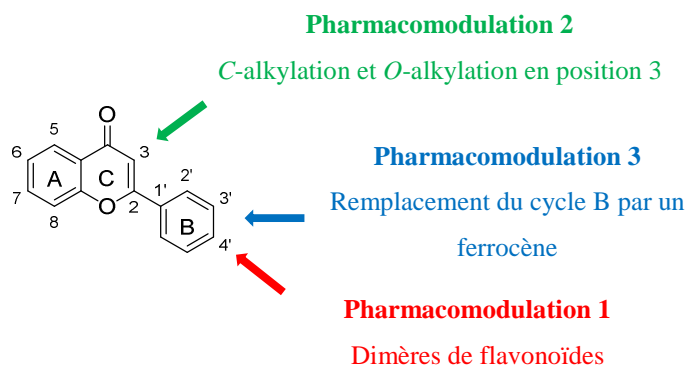


Figure 102 : Pharmacomodulations entreprises à partir de la flavone, ainsi que sa numérotation et la nomenclature de ses cycles.

Nous avons concentré nos efforts autour de trois axes de pharmacomodulations (**Figure 102**) :

- **pharmacomodulation 1** : identification de nouvelles structures correspondant à des dimères de flavonoïdes ;⁴⁰⁷
- **pharmacomodulation 2** : la position 3 de la flavone étant une position stratégique en termes d'activité biologique sur MRP1, l'influence d'une C-alkylation et d'une O-alkylation en cette position a été étudiée ;
- **pharmacomodulation 3** : introduction d'un nouvel élément structural, le ferrocène. En effet, le couple $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ est intéressant car il est capable d'intervenir dans les mécanismes rédox des cellules.

A l'issue de l'ensemble de ces pharmacomodulations, 26 composés ont été envoyés en tests biologiques. Les différents tests biologiques ont été réalisés à l'IBCP de Lyon.

II.3. PROCÉDÉS D'ÉVALUATION BIOLOGIQUE DES ANALOGUES SYNTHÉTISÉS

L'efflux net de GSH ainsi que la cytotoxicité sur des lignées cellulaires contrôle et résistante induits par chaque composé ont été déterminés selon deux tests biologiques.

II.3.1. Détermination de l'efflux net de GSH

Ce test permet de déterminer la capacité des composés synthétisés à induire ou non un efflux massif de GSH. Il est réalisé sur les lignées cellulaires de hamster BHK (*Baby Hamster*

CHAPITRE 3. MODULATION DE LA PROTÉINE MRP1

Kidney) transfectées, soit avec le vecteur vide (BHK-21wt), soit avec le vecteur contenant le gène codant pour MRP1 (BHK-21-MRP1). Ce dosage permet de déterminer la quantité totale de GSH intracellulaire (GSH + GSSG) et repose sur la méthode enzymatique de Tietze, adaptée par Anderson.⁴⁰⁸ Il se déroule selon deux réactions cycliques simultanées (**Figure 103**) :

- l'enzyme GSH réductase catalyse la réduction du GSSG en deux molécules de GSH par l'intermédiaire de la forme réduite du NADPH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate) ;
- le DTNB (Acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque)) oxyde le GSH en GSSG, pour former 2 équivalents de TNB (acide 2-nitro-5-mercaptobenzoïque) jaune qui absorbe à 412 nm.

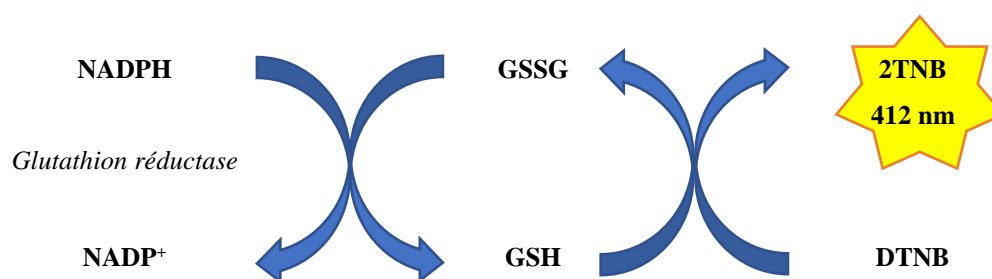


Figure 103 : Principe du dosage du GSH intracellulaire total.

La vitesse de la réaction peut être mesurée en suivant l'apparition de la coloration jaune. Cette vitesse étant proportionnelle à la quantité en GSH, il est alors possible de doser le GSH total (GSH + GSSG) d'un échantillon. La quantité de GSH intracellulaire total est mesurée au sein des cellules contrôles et des cellules transfectées par MRP1. Après 3 heures d'incubation, les cellules, en absence ou en présence de 5 et 20 μ M de chaque molécule étudiée, sont lysées. A ce lysat cellulaire sont ajoutés le NADPH, la GSH réductase ainsi que le DTNB, puis l'absorbance est lue à 412 nm toutes les 30 secondes pendant 2 minutes. Le contenu total en GSH est finalement quantifié par comparaison avec une courbe d'étalonnage de concentrations connues de GSH. La concentration intracellulaire totale en glutathion est exprimée en nmol par mg de protéine et les tests sont réalisés en duplicata ou triplicata.

Le pourcentage d'efflux de GSH au sein des cellules contrôles et des cellules transfectées par MRP1 est exprimé en pourcentage, les cellules non traitées présentant un pourcentage de GSH de 100%. Le pourcentage d'efflux de GSH induit par les composés testés est ainsi déterminé pour chaque lignée cellulaire puis l'effet spécifique de chaque composé sur les

cellules transfectées par MRP1 est corrigé de l'effet induit sur les cellules contrôles afin d'obtenir **l'efflux net de GSH**. L'efflux net de GSH correspond ainsi à la formule suivante :

$$\text{Efflux net de GSH} = \text{Efflux de GSH (BHK-21-MRP1)} - \text{Efflux de GSH (BHK-21wt)}$$

II.3.2. Détermination de la cytotoxicité

Ce test permet de vérifier la corrélation entre l'efflux de GSH et la mort cellulaire et de détecter un profil de sensibilité collatérale. Ce test n'est réalisé que sur les composés provoquant un efflux de GSH supérieur à 40%. Le principe de ce test est expliqué dans le chapitre 2, paragraphe II.4.1 (page 100). Il est réalisé sur la lignée cellulaire **NCI-H69** issue de cellules sensibles du cancer du poumon humain à petites cellules et sur la lignée **H69AR** issue de cellules résistantes, surexprimant MRP1, obtenues par exposition des cellules NCI-H69 à la doxorubicine.

II.4. PHARMACOMODULATION 1 : LES DIMÈRES DE FLAVONOÏDES

II.4.1. Les dimères d'apigénine, inducteurs de sensibilité collatérale chez MRP1

De nombreux exemples dans la littérature attestent de l'efficacité de l'emploi de ligands bivalents ou multivalents capables de se lier simultanément à plusieurs récepteurs d'une même protéine.^{409, 410} En effet, ces ligands sont connus pour être biologiquement plus actifs et sélectifs que les ligands monovalents correspondants.

La protéine P-gp présentant plusieurs sites d'interaction, de nombreuses études se sont intéressées à la synthèse de ligands polyvalents. En particulier, différents homodimères se sont avérés être capable d'inverser le phénotype MDR chez la P-gp, d'une manière bien plus efficace que les monomères correspondants.^{411, 412} En particulier, les travaux réalisés par l'équipe de Wong et Chow ont prouvé l'efficacité d'homodimères de l'apigénine, espacée par quatre motifs éthylène glycol dans la modulation de l'activité de la P-gp pour le traitement du phénotype MDR.^{413, 414}

CHAPITRE 3. MODULATION DE LA PROTÉINE MRP1

La protéine P-gp possédant des propriétés structurales et fonctionnelles similaires à MRP1, cette même équipe a poursuivi ses travaux en appliquant une approche identique à l'activité de transport de MRP1.⁴⁰⁷

Remarque : Les dimères testés dans le cadre de l'étude de la P-gp ne sont quasiment pas actifs sur MRP1 suggérant ainsi que les sites d'interaction de MRP1 ne sont pas localisés de la même manière que sur la P-gp.

D'après les résultats issus de cette étude, le dimère **4e** (Figure 104) s'avère être un excellent modulateur de MRP1, non cytotoxique. En effet, ce composé présente la plus faible valeur d'EC₅₀ (73 ± 13 nM) pour l'inversion de la résistance à la doxorubicine régulée par MRP1 et est respectivement 36, 247 et 6849 fois plus actif que le vérapamil, le MK571 et le probénécide, trois modulateurs connus de MRP1.

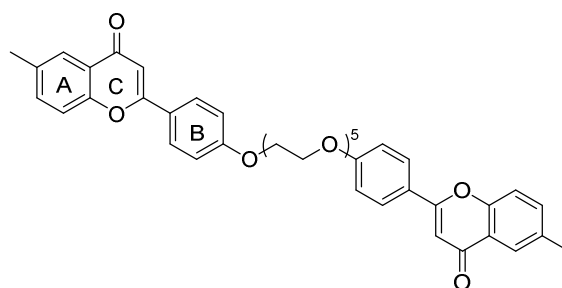


Figure 104 : Structure du dimère **4e**.

D'après les études *in vitro*, réalisées au sein de l'IBCP de Lyon, le dimère **4e** est capable d'induire un efflux massif de GSH au sein des cellules BHK-21 transfectées avec MRP1. En effet, un efflux net de GSH de $51 \pm 7\%$ est observé pour une concentration de dimère **4e** de $0,1 \mu\text{M}$ (Tableau 32).

% Efflux net GSH		
0,1 μM	0,5 μM	2 μM
51 ± 7	58 ± 5	59 ± 5

Tableau 32 : Efflux net de GSH du dimère **4e** sur les cellules BHK-21. Les valeurs représentent la moyenne \pm la déviation standard sur un minimum de trois expériences indépendantes.

CHAPITRE 3. MODULATION DE LA PROTÉINE MRP1

De plus, le dimère **4e** présente un profil de sensibilité collatérale. En effet, il est capable d'induire sélectivement la mort par apoptose des cellules résistantes surexprimant MRP1 par rapport aux cellules contrôles et ceci sur deux lignées cellulaires distinctes (**Figure 105**).

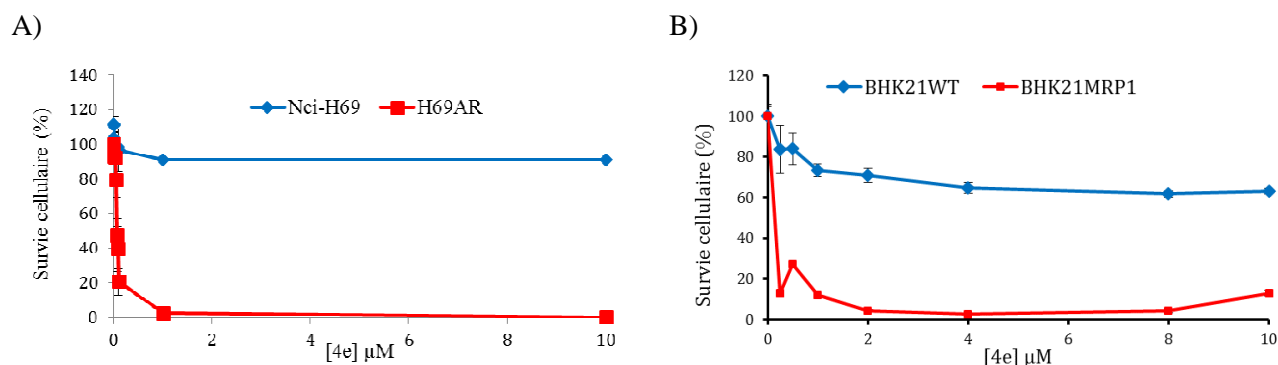


Figure 105 : Évolution de la survie cellulaire en fonction de la concentration en dimère **4e** sur A) les cellules NCI-H69 (contrôles) et H69AR (résistantes) et B) les cellules BHK-21wt (contrôles) et BHK-21-MRP1 (résistantes).

Le dimère **4e** est actuellement en cours de tests *in vivo*, au sein de l'Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université Lyon 1. À partir de ces résultats, nous avons entrepris la conception et la synthèse de nouveaux homodimères dérivés de l'apigénine.

Trois points de pharmacomodulations ont été envisagés lors de cette étude :

- la modulation du bras espaceur : variation de la longueur de la chaîne alkyle ($n = 2$ et 3) ;
- la modulation de la nature du flavonoïde : synthèse d'homodimères de chalcones et de flavones ;
- la substitution du cycle A : présence de groupement méthoxy en *ortho* et en *para* de la fonction carbonyle.

Au total, quatre homodimères ont été synthétisés et testés biologiquement (**Figure 106**).

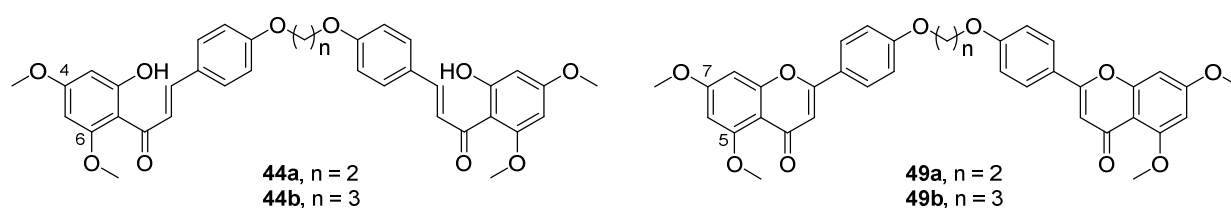


Figure 106 : Homodimères de dérivés de l'apigénine mis au point au laboratoire.

II.4.2. Synthèse des dimères ciblés

II.4.2.1 Re-synthèse du dimère 4e

Le dimère **4e**, excellent inducteur de sensibilité collatérale, est actuellement en phase de test *in vivo* chez nos collaborateurs biologistes de l'IBCP de Lyon. Il a ainsi été nécessaire d'en synthétiser plusieurs centaines de milligrammes. Nous avons ainsi suivi les conditions développées par l'équipe de Wong et Chow (**Schéma réactionnel 15**).⁴⁰⁷

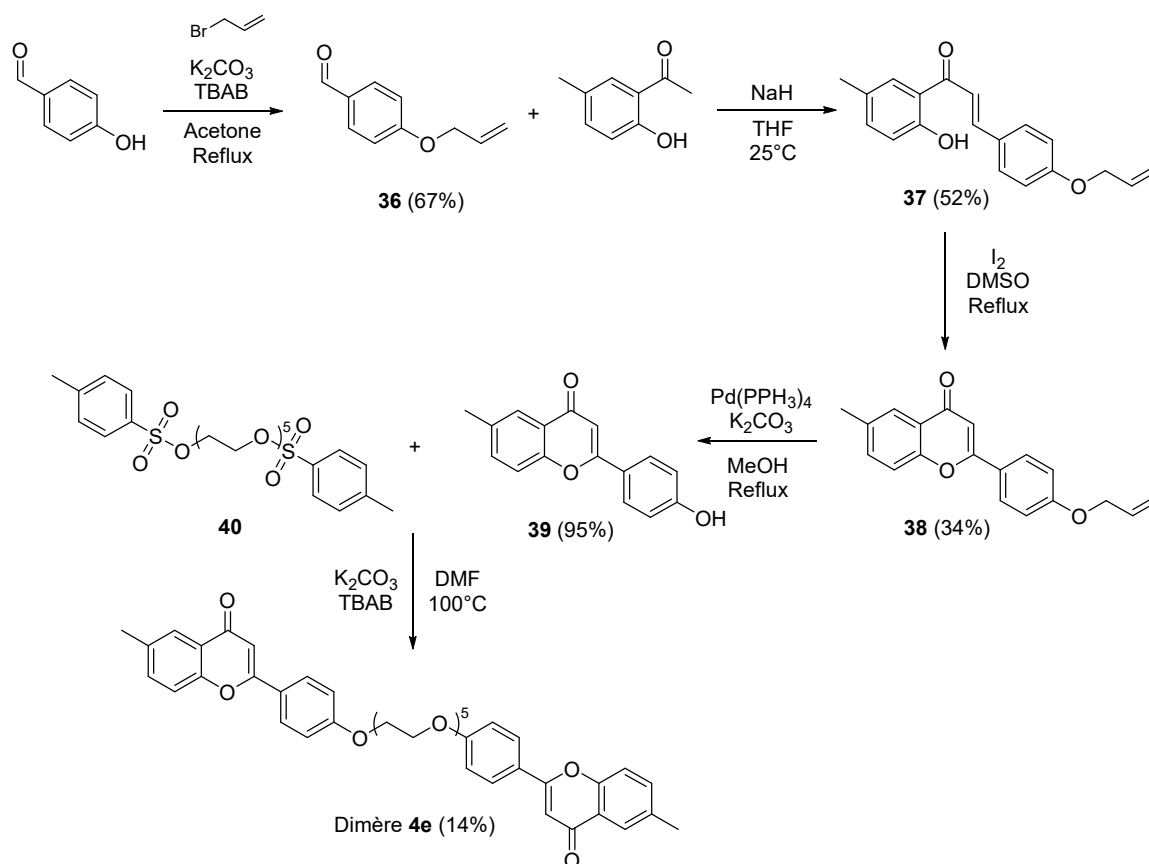


Schéma réactionnel 15 : Synthèse du dimère 4e.

La synthèse du dimère **4e** s'effectue en cinq étapes. Une première étape consiste en la protection du 4-hydroxybenzaldéhyde par alkylation de la fonction phénol avec du bromure d'allyle en présence de carbonate de potassium et de bromure de tétrabutylammonium à reflux dans l'acétone afin d'obtenir le composé **36** avec un rendement de 67%. Le TBAB joue ici le rôle de catalyseur de transfert de phase. Il est nécessaire de protéger le 4-hydroxybenzaldéhyde car, lors de la condensation avec l'acétophénone, la base forte utilisée déprotone également la fonction phénol du 4-hydroxybenzaldéhyde. Cette déprotection tend à

enrichir le cycle aromatique en électron et à diminuer la réactivité de l'aldéhyde contrecarrant ainsi la formation de la chalcone. D'après la littérature, le groupement allyle, pouvant être retiré dans des conditions douces, a été choisi. En effet, un groupement se déprotégeant en milieu basique fort aurait été contradictoire avec la synthèse de la chalcone. De même, un groupement éliminé en milieu acide pourrait conduire à une déméthylation des groupements méthoxy. Une autre alternative aurait pu être l'utilisation des éthers de silyle.

Le composé **36** ainsi obtenu est ensuite condensé avec la 2-hydroxy-5-méthylacétophénone par action de l'hydruire de sodium à température ambiante dans le THF afin de former la chalcone **37** avec un rendement de 52%. Une étape de cyclisation oxydante par action du diiode à reflux dans le DMSO permet de transformer la chalcone **37** en chromone **38** avec un rendement de 34%. Le groupement allyl est ensuite retiré en présence de palladium de tetrakis en milieu basique afin de conduire au monomère **39** de manière quantitative. Pour finir, une substitution nucléophile intermoléculaire avec le dérivé ditosylé **40** en milieu basique permet d'obtenir le **dimère 4e** avec un rendement de 14%. Le dérivé **40** a quant à lui été obtenu par activation du pentaéthylène glycol avec du chlorure de tosyloxy en milieu basique avec un rendement de 98% (**Schéma réactionnel 16**).

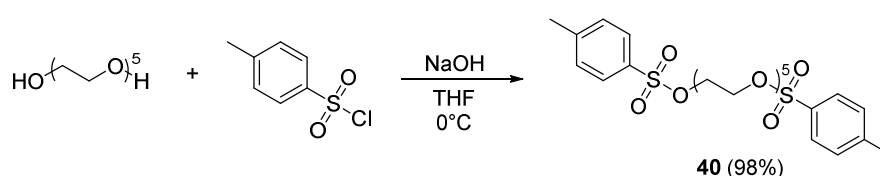


Schéma réactionnel 16 : Synthèse du composé **40**.

II.4.2.2 Synthèse des dimères 44a/b et 49a/b

D'après les travaux de Wong et Chow,⁴⁰⁷ deux voies rétrosynthétiques sont possibles afin de synthétiser les dimères souhaités à partir du 4-hydroxybenzaldéhyde (**Schéma rétrosynthétique 2**).

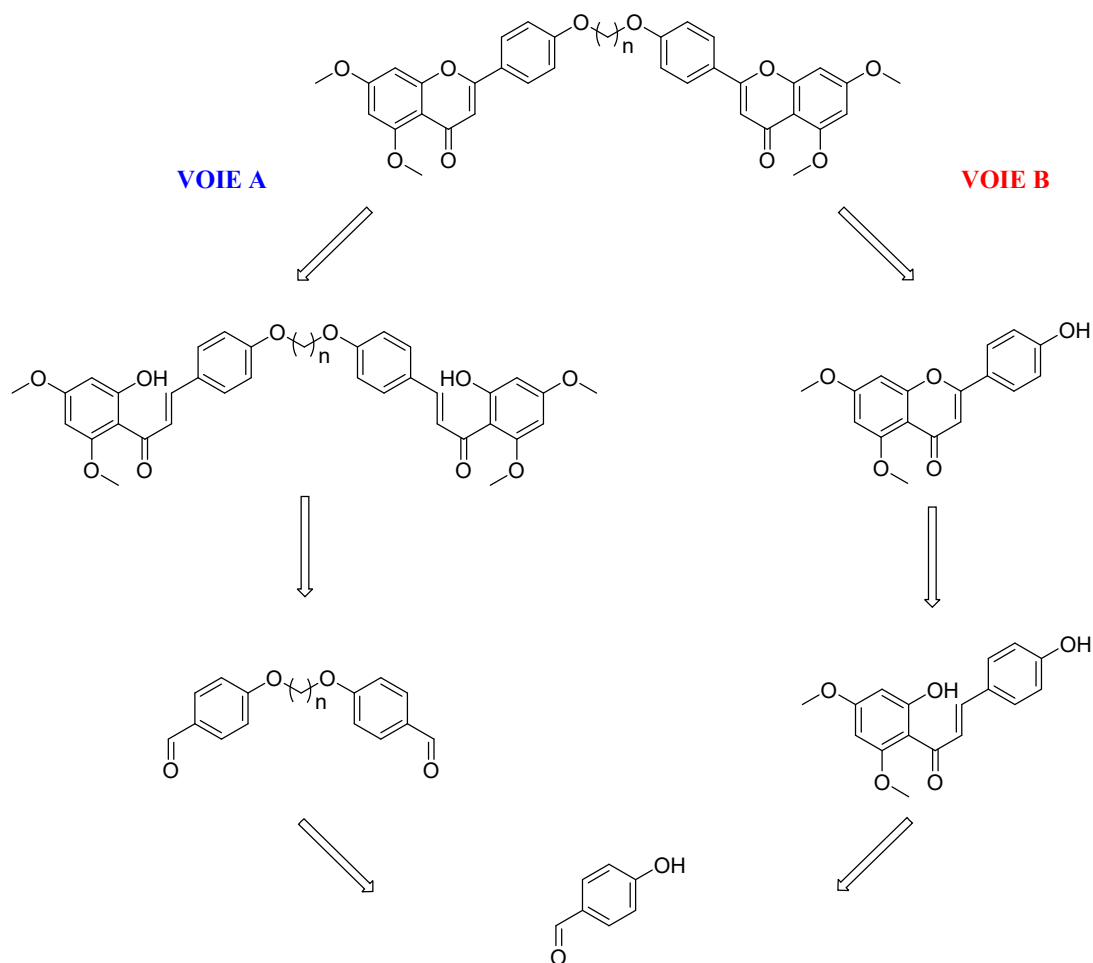


Schéma rétrosynthétique 2 pour la synthèse des homodimères cibles.

La voie A débute par la formation d'un homodimère à partir du 4-hydroxybenzaldéhyde suivie d'une étape d'aldolisation-crotonisation et d'une étape de cyclisation. Au contraire, pour la voie B, le dérivé de l'apigénine est synthétisé dans un premier temps suivi par la formation de l'homodimère.

○ Synthèse par la voie A

Dans un premier temps, nous avons suivi la voie A constituée de trois étapes à partir du 4-hydroxybenzaldéhyde (**Schéma réactionnel 17**).

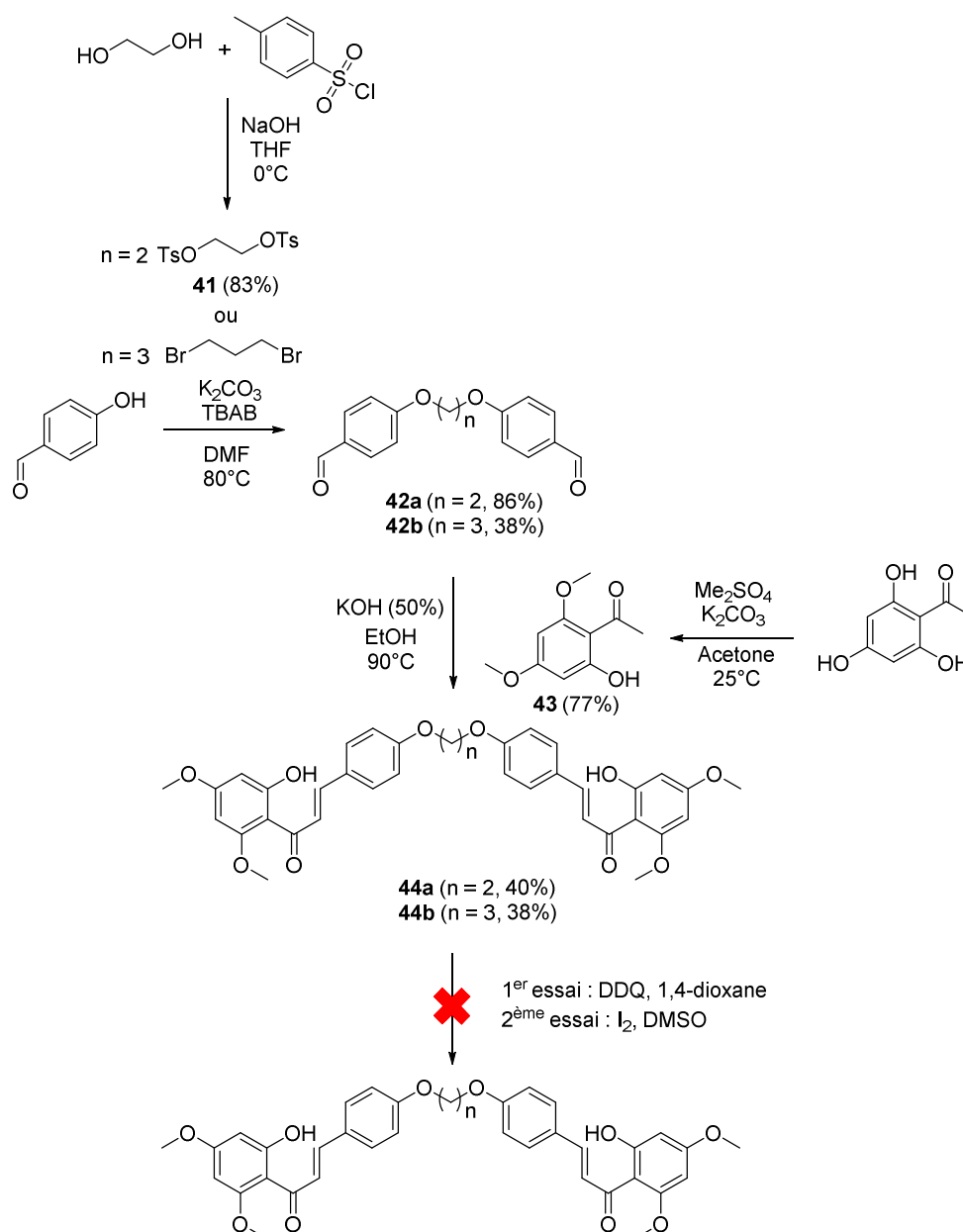


Schéma réactionnel 17 : Synthèse des homodimères cibles par la voie A.

Pour former ces dimères, le 4-hydroxybenzaldéhyde est mis en réaction avec un agent dialkylant : le composé **41** pour $n = 2$ issu de l'activation de l'éthylène glycol avec du chlorure de tosylate et avec le 1,3-dibromopropane pour $n = 3$. Cette dimérisation est réalisée en milieu basique en présence de carbonate de potassium et d'un ammonium quaternaire afin de former les bisaldéhydes **42a** et **42b** avec des rendements respectifs de 86% et 38%. Puis les bischalcones **44a** et **44b** ont été préparées par une réaction d'aldolisation-crotonisation en milieu basique entre les composés **42a** et **42b** et l'acétophénone **43** issue de la diméthoxylation de la 2,4,6-trihydroxyacétophénone. Cette diméthoxylation est réalisée à température ambiante dans l'acétone en présence de carbonate de potassium et de

CHAPITRE 3. MODULATION DE LA PROTÉINE MRP1

diméthylsulfate comme agent alkylant. Cependant, les différents essais de cyclisation oxydante, à savoir l'utilisation de la DDQ et de diode à chaud dans différents solvants sur les bischalcones **44a** et **44b** se sont soldés par des échecs. Nous avons donc envisagé la voie B.

○ Synthèse par la voie B

La synthèse des dimères par la voie B se réalise en deux étapes, dans un premier temps la formation du monomère, dérivé de l'apigénine, puis une seconde étape d'homodimérisation (**Schéma réactionnel 18**). Cette voie présente l'avantage de pouvoir moduler plus facilement les dimères en modifiant, lors de la dernière étape, la nature du bras espaceur reliant les deux unités des dérivés de l'apigénine.

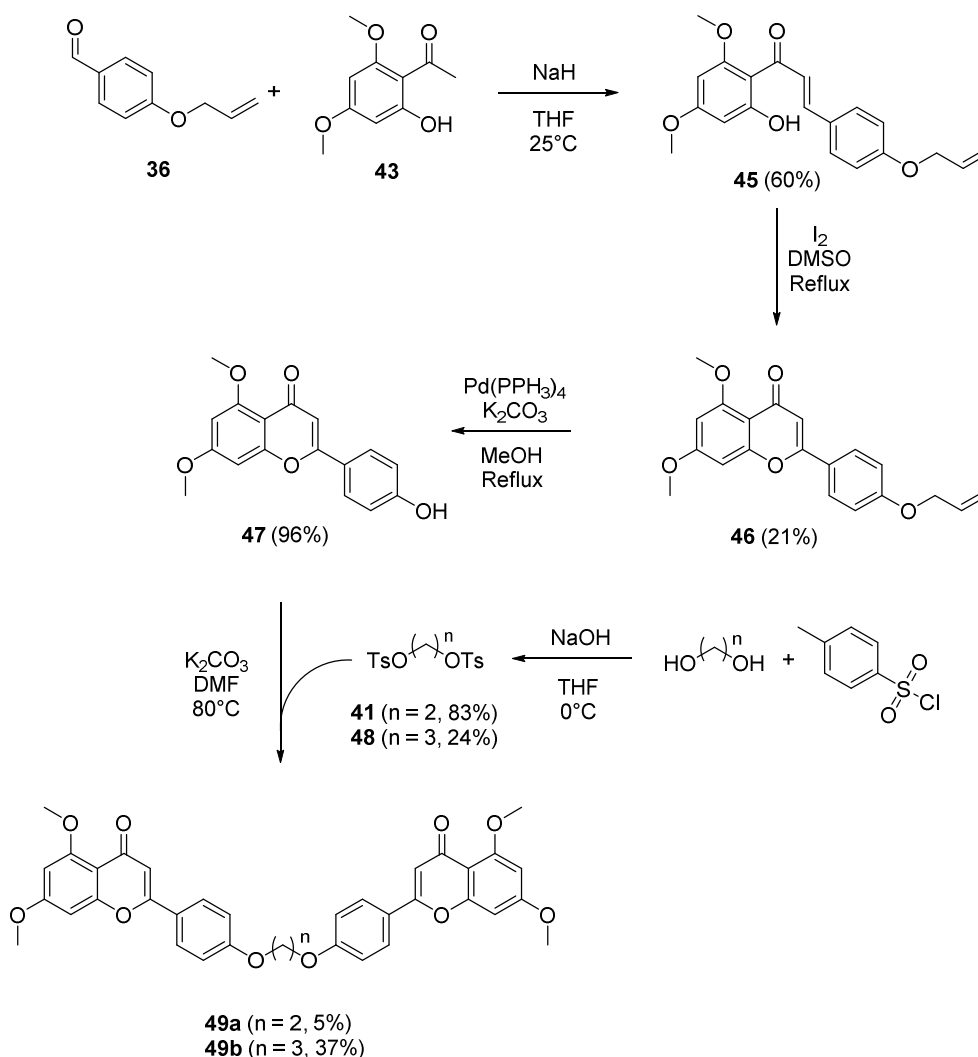


Schéma réactionnel 18 : Synthèse des homodimères cibles par la voie B.

CHAPITRE 3. MODULATION DE LA PROTÉINE MRP1

La 2-hydroxy-4,6-méthoxyacétophénone **43** est condensée avec le 4-allylbenzaldéhyde **36** en condition basique afin de conduire à la chalcone **45** avec un rendement de 60%. Puis une cyclisation oxydante en présence de diiode dans le DMSO permet d'obtenir la chromone **46** correspondante avec un rendement de 21%. Pour finir le groupement allyle est retiré en présence de Pd(PPh₃)₄ en milieu basique afin de conduire au monomère **47** avec un rendement de 96%.

Dans un second temps, l'étape d'homodimérisation du dérivé **47** est réalisée par une réaction de dialkylation avec un demi-équivalent d'un dérivé bitosylé, possédant une chaîne éthyle (**41**) ou propyle (**48**), en présence de carbonate de potassium dans le DMF à chaud, afin d'obtenir respectivement les homodimères **49a** et **49b**.

II.4.3. Évaluation biologique des dimères ciblés

Les résultats biologiques issus du dosage intracellulaire du GSH pour les quatre composés testés à 5 et 20 µM sur les cellules contrôles (BHK-21wt) et les cellules surexprimant MRP1 (BHK-21-MRP1) sont résumés dans le **Tableau 33**.

Référence	% Efflux net GSH		
	2 µM	5 µM	20 µM
Dimère 4e	59,4	/	/
Vérapamil	/	66,1	96,8
44a	/	10,2	5,6
44b	/	3,7	1,8
49a	/	4,1	2,5
49b	/	14,4	27,2

Tableau 33 : Efflux net de GSH sur les cellules BHK-21. Le dimère **4e** et le vérapamil sont utilisés comme composés de référence.

Les quatre dimères synthétisés induisent un efflux net de GSH relativement faible par rapport au vérapamil et au dimère **4e**. En effet, à 20 µM, les composés **44a**, **44b**, **49a** et **49b** induisent un efflux net de GSH respectivement 17, 54, 39 et 3,5 fois inférieur au vérapamil.

La cytotoxicité des dimères de chalcones **44a** et **44b** a tout de même été évaluée grâce au test MTT sur les cellules sensibles (NCI-H69) et les cellules surexprimant MRP1 (H69AR). Les

courbes représentant l'évolution de la survie cellulaire en fonction de la concentration en composés **44a** et **44b** sont représentées **Figure 107**.

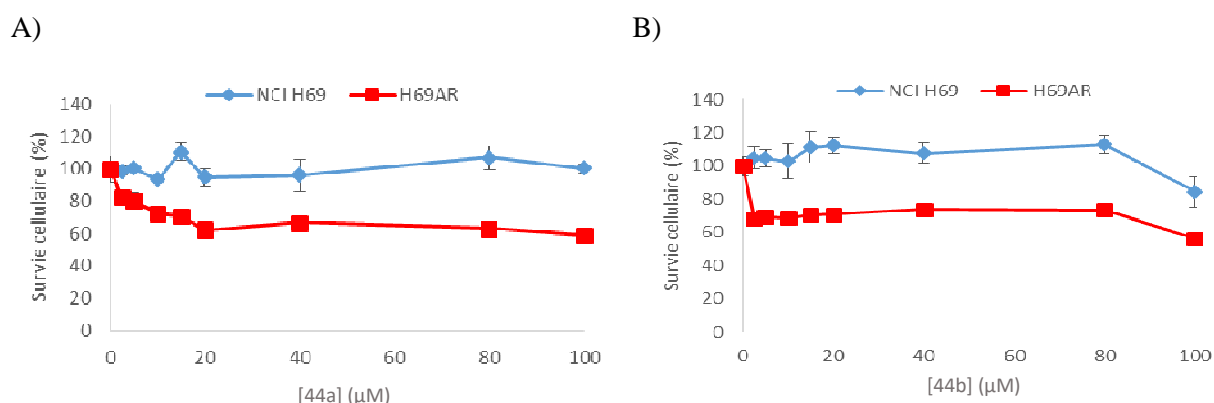


Figure 107 : Évolution de la survie cellulaire en fonction des concentrations de **44a** (A) et de **44b** (B).

Un faible effet de cytotoxicité est observé préférentiellement sur les lignées cellulaires résistantes surexprimant MRP1. Mais cet effet n'a pu permettre la détermination des EC_{50} car trop faible dans la gamme de concentrations étudiées.

Pour conclure les quatre dimères testés n'induisent pas d'efflux de GSH conséquent et pour deux d'entre eux, n'entraînent pas de mort cellulaire par apoptose des cellules surexprimant MRP1. Ainsi, suite à ces résultats négatifs, et à la très faible solubilité des composés testés, nous avons décidé de concentrer nos recherches sur des structures de plus petites tailles telles que des monomères de flavones.

II.5. PHARMACOMODULATION 2 : MODULATION DE LA SUBSTITUTION EN POSITION 3 DE LA FLAVONE

II.5.1. Impact de la position 3 de la flavone sur la sensibilité collatérale

Nous nous sommes intéressés à l'alkylation de la position 3 de la flavone. En effet, suite à des résultats obtenus antérieurement au laboratoire, cette position semble être importante pour la sensibilité collatérale.⁴⁰³ Il a été récemment prouvé que l'absence d'un groupement hydroxyle en position 3 de la flavone est une condition nécessaire afin d'induire une mort sélective des cellules surexprimant MRP1.⁴⁰³ En effet, la galangine et le kaempférol sont deux flavones hydroxylées en position 3 capables d'induire un efflux massif de GSH (efflux net de GSH

respectifs 85 et 73%) mais ne conduisent pas à une mort sélective par apoptose des cellules surexprimant MRP1 (**Figure 108**).

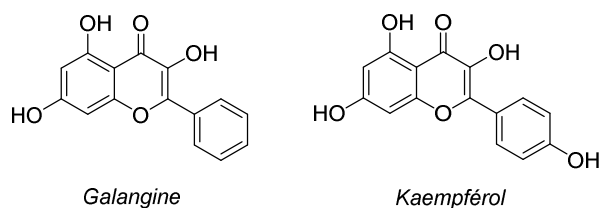


Figure 108 : Structures de la galangine et du kaempferol.

Au contraire, la 3-méthoxychrysrine (**Figure 109**), présentant un groupement méthoxylé en position 3, présente un pourcentage d'efflux net en GSH de 65,6% et est capable d'induire une mort sélective des cellules surexprimant MRP1, avec une EC_{50} de 4,1 μ M et une sélectivité de 24,5 par rapport aux cellules parentales.

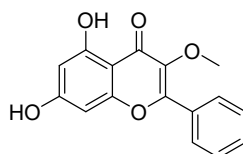


Figure 109 : Structure de la 3-méthoxychrysrine.

Nous avons ainsi trouvé intéressant dans un premier temps de remplacer le groupement méthoxy par différents groupements alkyloxy afin d'en étudier l'impact sur le profil pharmacologique. Afin de simplifier les synthèses, nous avons réalisé ces modulations sur la 3-hydroxyflavone, disponible commercialement. Quatre groupements alkyles ont été utilisés : éthyle, propyle, isopropyle et benzyle (**Figure 110**).

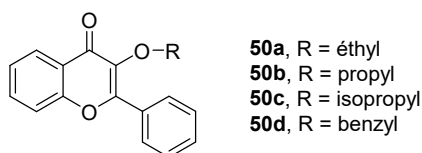


Figure 110 : Dérivés *O*-alkylés en position 3 de la flavone.

Nous avons également décidé de concentrer nos efforts sur l'impact pharmacologique de dérivés *C*-alkylés en position 3 de flavone (**Figure 111**).

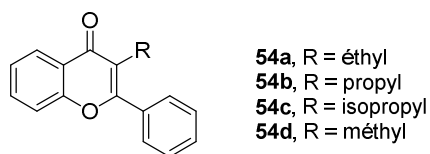


Figure 111 : Analogues C-alkylés en position 3 de la flavone.

Les 3-méthylflavones sont des composés rares dans la nature mais deux dérivés naturels ont tout de même été isolés d'*Eugenia kurzii* (3-C-méthylapigénin-5-O-rhamnoside et 3-C-méthyllutéolin-5-O-rhamnoside).⁴¹⁵ Ce type de composés présente des propriétés antioxydantes⁴¹⁶ et certaines activités biologiques (activités antibactériennes,⁴¹⁶ prévention de l'oxydation de la lipoprotéine de basse densité (LDL)⁴¹⁷ ayant un impact direct sur le cholestérol). Ainsi nous avons décidé d'étudier l'impact de l'addition d'une chaîne alkyle lipophile en position 3 sur les propriétés pharmacologiques recherchées pour MRP1.

II.5.2. Synthèse des analogues O-alkylés et C-alkylés en position 3 de la flavone

II.5.2.1 Synthèse des dérivés O-alkylés 50a à 50d

Ces composés ont été obtenus en une seule étape par alkylation de la fonction hydroxy de la 3-hydroxyflavone à l'aide de différents halogénoalcane en condition basiques avec des rendements compris entre 17% et 67% (**Schéma réactionnel 19**). Une fois encore, cette alkylation phénolique est réalisée en présence de TBAB, jouant le rôle de catalyseur de transfert de phase.

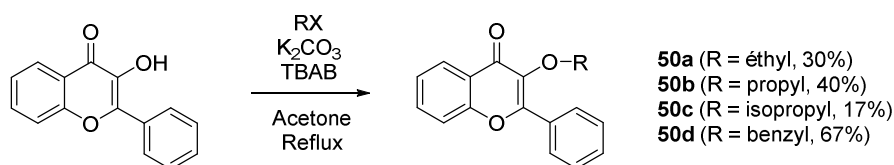


Schéma réactionnel 19 : Synthèse des dérivés O-alkylés de la 3-hydroxyflavone.

II.5.2.2 Synthèse des dérivés C-alkylés 54a à 54d

La première voie explorée afin d'obtenir les dérivés de flavone C-alkylés souhaités a été la synthèse d'un intermédiaire de type chalcone conduisant, à l'issue d'une cyclisation oxydante, aux dérivés désirés (**Schéma rétrosynthétique 3**).

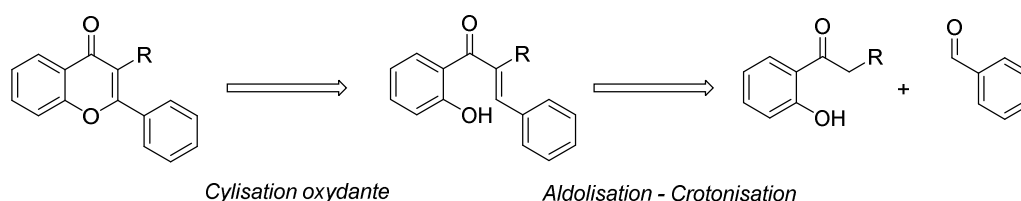


Schéma rétrosynthétique 3 via un intermédiaire de type chromone.

Dans un premier temps ont été synthétisés les dérivés de l'acétophénone présentant différents groupements R (composés **52a** à **52c**) (**Schéma réactionnel 20**).

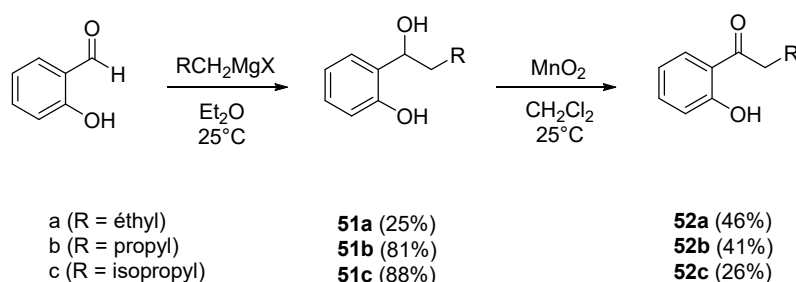


Schéma réactionnel 20 : Synthèse des dérivés de l'acétophénone **52a** à **52c**.

Leur synthèse s'effectue en deux étapes à partir du salicylaldéhyde engagé avec un réactif de Grignard en présence de différents bromures d'alkylmagnésium dans l'éther pour former les alcools secondaires **51a** à **51c** avec des rendements compris entre 25% et 88%.⁴¹⁸ Ces composés ont ensuite été oxydés par action de l'oxyde de manganèse (IV) afin d'obtenir les cétones **52a** à **52c** avec des rendements compris entre 26% et 46%. D'autres agents oxydants ont également été testés pour cette dernière étape, tels que le périodine de Dess Martin ou le chlorochromate de pyridinium (PCC). Mais en raison, respectivement, de leur coût et de leur toxicité, nous avons privilégié l'utilisation de l'oxyde de manganèse (IV).

Une fois les dérivés de l'acétophénone synthétisés, nous avons entrepris la synthèse des intermédiaires chalcones correspondants. Différentes conditions ont été utilisées telles que l'utilisation d'hydruure de sodium dans le THF à 25°C ou l'hydroxyde de potassium dans l'éthanol à 90°C. Malheureusement, aucune des conditions classiques n'a permis d'obtenir les

intermédiaires chalcones souhaités. En effet, uniquement les produits de départ et de décomposition ont pu être observés (**Schéma réactionnel 21**).

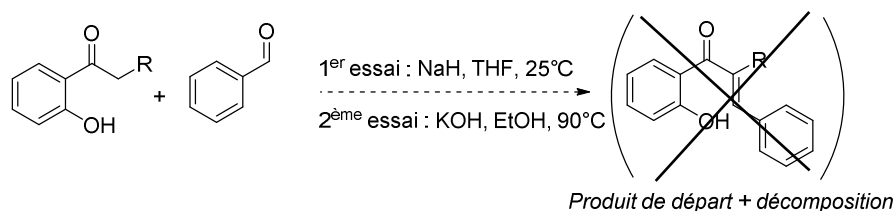


Schéma réactionnel 21 : Essais de synthèse des intermédiaires chalcones.

Nous nous sommes ainsi intéressés à une seconde voie de synthèse à partir de la flavanone, C-alkylée dans un premier temps puis oxydée afin de conduire aux dérivés souhaités (**Schéma rétrosynthétique 4**).

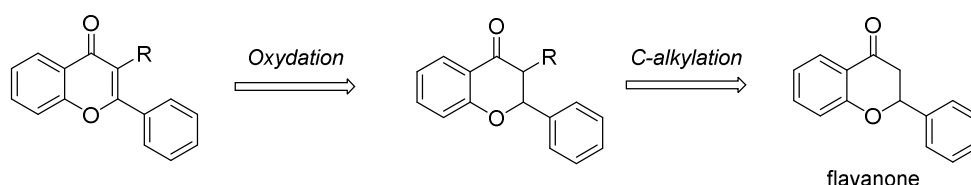


Schéma rétrosynthétique 4 via la flavanone.

Après plusieurs essais dans différentes conditions, telles que l'utilisation d'hydruure de sodium dans le DMF à 25°C ou de *N,N*-diisopropylamidure de lithium (LDA) dans le THF à -78°C, nous ne sommes pas parvenus à obtenir les dérivés alkylés souhaités. En effet, dans chaque cas, on a pu observer une ouverture de cycle conduisant à un dérivé chalcone (**Schéma réactionnel 22**).

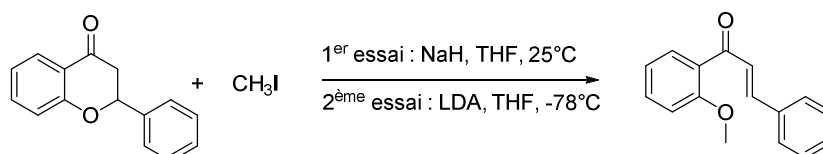


Schéma réactionnel 22 : Essais d'alkylation de la flavanone.

Suite à cet échec, une nouvelle voie de synthèse a été tentée. En effet, plusieurs articles décrivent la synthèse de flavones C-alkylées en position 3 à partir d'ester de benzoate par le biais d'un intermédiaire de type dicétone (**Schéma rétrosynthétique 5**).^{419, 420}

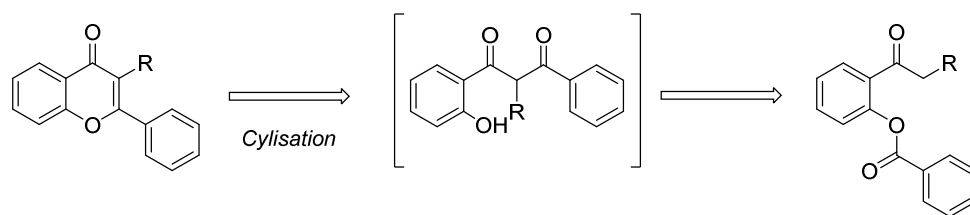


Schéma rétrosynthétique 5 via un intermédiaire de type dicétone.

La synthèse correspondant à cette nouvelle voie d'accès est représentée dans le **Schéma réactionnel 23**.

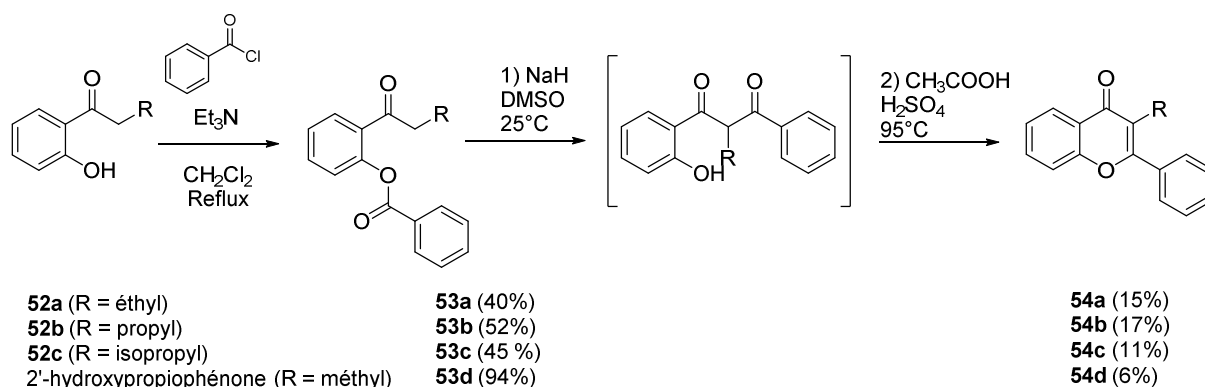


Schéma réactionnel 23 : Synthèse des dérivés **54a** à **54d**.

Les esters de benzoate **53a** à **53d** ont été obtenus par estérification des dérivés **52a** à **52c** et de la 2-hydroxypropiophénone commerciale avec le chlorure de benzoyle, en présence de triéthylamine dans le dichlorométhane avec des rendements compris entre 40% et 94%. Puis un réarrangement de Baker-Venkataraman^{419, 420} (réaction de condensation de type Claisen) en présence d'hydruure de sodium dans le DMSO a conduit à la formation d'une dicétone intermédiaire, cyclisée ensuite par action d'acide acétique et d'acide sulfurique. Ceci permet l'obtention des flavones C-alkylés **54a** à **54d** souhaitées avec des rendements compris entre 6% et 17%.

II.5.3. Évaluation biologique des analogues *O*-alkylés et *C*-alkylés en position 3 de la flavone

II.5.3.1 Évaluation biologique des analogues *O*-alkylés 50a à 50d

Les composés **50a** à **50d** ont été dans un premier temps testés pour leur capacité à induire un efflux massif de GSH sur les cellules contrôles BHK-21wt et les cellules BHK-21-MRP1, surexprimant MRP1 (**Tableau 34**).

Référence	% Efflux net GSH	
	5 μ M	20 μ M
Vérapamil	66,1	96,8
3-Méthoxychrysine	19,1	65,6
50a	13,1	26,6
50b	2,6	31,0
50c	0,0	-0,9
50d	13,6	26,1

Tableau 34 : Efflux net de GSH sur les cellules BHK-21. Le niveau de GSH intracellulaire a été déterminé au sein des cellules sensibles BHK-21 contrôle et des cellules résistantes BHK-21-MRP1.

A l'exception du composé **50c** qui ne présente aucun efflux de GSH détecté, les dérivés **50a**, **50b** et **50d** présentent des efflux net de GSH de 26 à 30% à 20 μ M, soit environ deux à trois fois inférieurs à la 3-méthoxychrysine et 3 à 4,5 inférieurs au vérapamil. Ainsi les tests de survie cellulaire n'ont pas été poursuivis pour ces composés.

En comparant ces résultats à l'efflux net de GSH induit par la 3-hydroxyflavone (12%), nous pouvons remarquer une faible augmentation de l'efflux apportée par l'alkylation du groupement hydroxylé. Mais cette amélioration reste tout de même modérée. Il aurait également été intéressant d'étudier différents dérivés *O*-alkylés en position 3 de la galangine.

II.5.3.2 Évaluation biologique des analogues *C*-alkylés 54a à 54d

Les composés **54a** à **54d** ont été testés dans un premier temps pour leur capacité à induire un efflux massif de GSH sur les cellules contrôles BHK-21wt et les cellules BHK-21-MRP1, surexprimant MRP1 afin de déterminer leur efflux net de GSH (**Tableau 35**).

Référence	% Efflux net GSH	
	5 μ M	20 μ M
Vérapamil	66,1	96,8
54a	1,7	0,0
54b	1,2	23,8
54c	15,5	20,7
54d	17,5	24,0

Tableau 35 : Efflux net de GSH sur les cellules BHK-21. Le niveau de GSH intracellulaire a été déterminé au sein des cellules sensibles BHK-21 contrôle et des cellules résistantes BHK-21-MRP1.

D'après les résultats obtenus, le composé **54a** portant un groupement éthyle en position 3 ne présente aucun efflux de GSH. A 20 μ M, les composés **54b** à **54d** présentent des efflux net de GSH compris entre 21 et 24% soit environ 5 fois inférieurs au vérapamil. Ces composés n'ont ainsi pas été jugés suffisamment actifs pour pouvoir être soumis au test de survie cellulaire.

Cette pharmacomodulation ne sera donc pas retenue comme la plus intéressante sur les modulations de la flavone nue en position 3. Une fois encore, cette pharmacomodulation pourrait s'avérer intéressante sur la galangine hydroxylée en positions 5 et 7.

II.6. PHARMACOMODULATION 3 : INTRODUCTION D'UN MOTIF FERROCÈNE

II.6.1. Le groupement ferrocène, pionnier de la chimie bioorganométallique

Le ferrocène est un complexe organométallique appartenant à la famille des métallocènes. Il s'agit d'un métal de transition, le fer, de degré d'oxydation II associé à deux anions cyclopentadiényles. La structure du ferrocène fut découverte en 1951 par Kealy et Pauson⁴²¹ et confirmée par Wilkinson en 1952.⁴²²

La ferrocène est un composé stable et lipophile. Il peut être facilement fonctionnalisé, par le biais de réactions de Friedel-Craft ou de lithiation. De plus, le ferrocène est non toxique⁴²³ et stable en milieu physiologique. Pour finir, le ferrocène présente des propriétés redox grâce au couple redox $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ stable. En effet, l'oxydation ou la réduction à un électron est réversible

et n'entraîne pas de variations structurales (**Figure 112**). Ainsi les sels ferricénium formés par l'oxydation du ferrocène sont stables mais sensibles en solution et présentent des activités antitumorales. En effet, l'état d'oxydation du Fe^{3+} serait responsable des effets cytotoxiques.

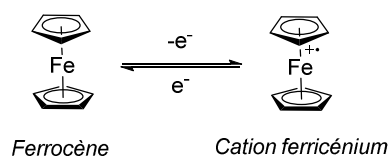


Figure 112 : Transfert d'un électron au sein du système $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$.

Grâce à l'ensemble de ses propriétés, le ferrocène constitue ainsi un bioisostère de choix du groupement phényle en chimie médicinale et nombreux sont les exemples montrant l'efficacité de l'introduction de ce groupement en termes d'activité biologique (propriétés anti-HIV,^{424, 425} antibactériennes⁴²⁶ et antiparasitaires⁴²⁷⁻⁴²⁹), d'élargissement du spectre thérapeutique⁴³⁰ et dans le contournement de phénomène de résistance aux médicaments.

Un exemple illustrant les apports du ferrocène est la ferroquine,^{427, 428} dérivé ferrocénique de la chloroquine (**Figure 113**). Alors que la chloroquine, antipaludique découvert dans les années 1930, connaît des problèmes de résistance, son analogue ferrocényle, la ferroquine, est active sur plusieurs souches. La ferroquine est ainsi actuellement développée par Sanofi et se trouve en phase II de tests cliniques.⁴³¹

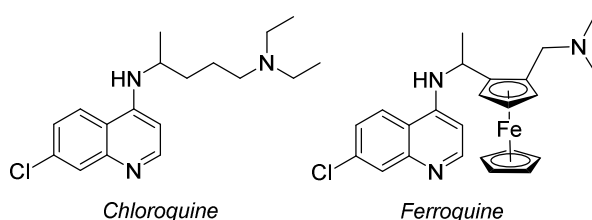


Figure 113 : Structures de la chloroquine et de la ferroquine.

Les ferrocènes sont également fortement impliqués dans la recherche de nouveaux anticancéreux. Dans le cas du cancer du sein on peut citer le ferrocifène, l'analogue ferrocénique du tamoxifène. Le tamoxifène (**Figure 114**) est utilisé pour traiter les cancers du sein hormono-dépendant, c'est-à-dire les cancers du sein pour lesquels le récepteur œstrogène est présent ($[\text{ER}(+)]$). L'action antiproliférative de la forme hydroxylée du tamoxifène (l'hydroxytamoxifène) provient principalement de l'effet antiœstrogénique causée par une

interaction compétitive au récepteur œstrogène qui empêche ainsi la transcription de l'ADN régulée par l'œstradiol. Malheureusement, certaines cellules cancéreuses du sein se révèlent être résistantes au tamoxifène car elles n'expriment pas le récepteur œstrogène ([ER(-)]) ou bien car elles ont développé une résistance au médicament sur le long terme. L'activité thérapeutique du tamoxifène et de l'hydroxytamoxifène est donc limitée. Au contraire, l'hydroxyferrocifène, dérivé ferrocénique de l'hydroxytamoxifène possède également un effet antiœstrogénique envers les cellules cancéreuses du sein [ER(+)] mais un effet cytotoxique sur les cellules [ER(+)] et [ER(-)], lui conférant ainsi une fenêtre thérapeutique très large.⁴³² La cytotoxicité observée pour les dérivés ferrocéniques semble provenir des propriétés redox du ferrocène, c'est-à-dire de l'oxydation *in situ* du Fe^{2+} en Fe^{3+} conduisant à la formation métabolique d'ions ferrocénium toxiques.⁴³³

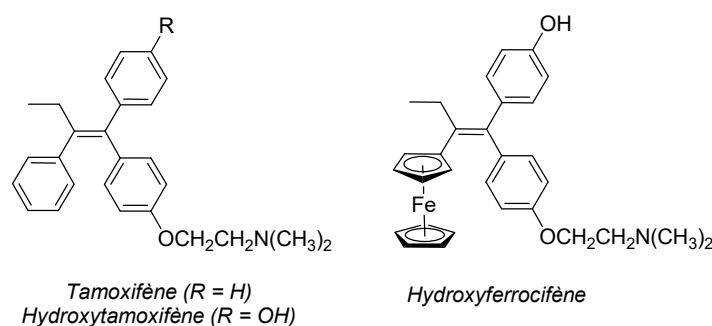
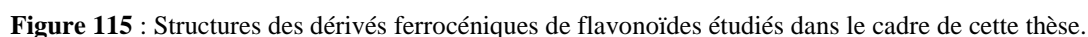


Figure 114 : Structures du tamoxifène, de l'hydroxytamoxifène et de l'hydroxyferrocifène.

Bien d'autres dérivés ferrocéniques, tels que des dérivés ferrocéniques polyphénoliques ou des ferrocènes conjuguées à des polymères, se sont avérés présenter diverses activités anticancéreuses.^{434, 435}

La combinaison d'un motif ferrocène avec des flavonoïdes semble être ainsi une voie prometteuse pour la conception et la synthèse de nouvelles molécules bioactives. Les chalcones ferrocéniques présentent d'ores et déjà des activités antipaludiques⁴³⁶ et antiplasmodiques.⁴³⁷ Récemment, l'équipe de Hillard et Jaouen a entrepris la synthèse de chalcones, d'aurones et de flavones ferrocéniques afin d'étudier leurs effets biologiques sur différentes cibles. Certaines chalcones ferrocéniques possèdent des propriétés inhibitrices de l'enzyme HIV-intégrase⁴³⁸ tandis que certaines aurones ferrocéniques se sont avérées présenter des propriétés antibactériennes (activité sur la souche MsrA, résistante surexprimant un transporteur ABC).⁴³⁹



Il a déjà été démontré lors de travaux antérieurs au laboratoire que la présence de groupements hydroxylés en position 5 et 7 du cycle A de la flavone permettait d'induire un meilleur efflux de GSH. Nous avons ainsi entrepris, dans un premier temps, la synthèse des analogues sans aucune substitution sur le cycle A, puis dans un second temps la synthèse des analogues méthoxylés puis hydroxylés en position 5 uniquement, en position 7 uniquement, et simultanément en positions 5 et 7.

II.6.2.1 Synthèse des dérivés chalcones ferrocéniques

Quatre analogues de chalcones ferrocéniques ont été synthétisés (**Figure 116**) : la chalcone ne présentant aucune substitution sur le cycle A (composé **55a**), les dérivés mono-méthoxylés en *ortho* (composé **55b**) et en *para* de la fonction carbonyle (composé **55c**) et le dérivé diméthoxylé en *ortho* et *para* (composé **55d**).

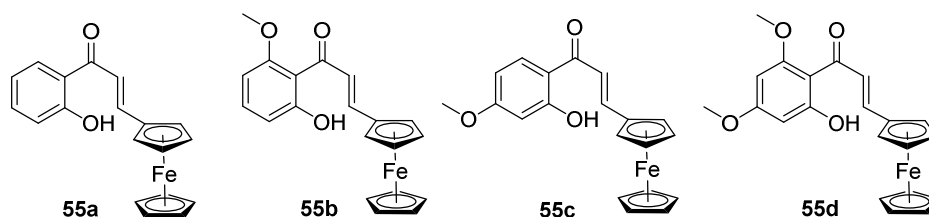


Figure 116 : Structures des dérivés chalcones ferrocéniques.

La synthèse de cette première série de composés a été effectuée par une réaction de condensation aldolique entre les acétophénone correspondantes commerciales et le ferrocène carboxaldéhyde, par action de l'hydruure de sodium dans le THF à 25°C. Ces composés ont été obtenus avec des rendements compris entre 34% et 92% (**Schéma réactionnel 24**).

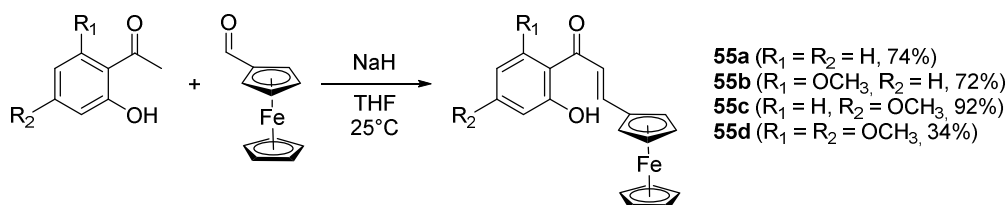


Schéma réactionnel 24 : Synthèse des dérivés chalcones ferrocéniques.

Alors que le ferrocène carboxaldéhyde est de couleur orange-rouge, les dérivés de chalcones ferrocéniques sont d'une couleur violette très prononcée, comme il l'est décrit dans la littérature.⁴³⁸ De plus, la structure de ces composés a été confirmée par analyses RMN. En effet, d'après les spectres RMN 1H obtenus, la présence de deux signaux au-delà de 6.5 ppm et présentant des constantes de couplages comprises entre 15 et 16 Hz nous confirme la présence de deux protons vinyliques. De plus, cette constante de couplage nous indique que l'énone est de configuration *E*.

II.6.2.2 Synthèse des dérivés aurones ferrocéniques

○ Synthèse des analogues aurones méthoxylés

Les aurones synthétisées dans le cadre de cette étude sont représentées sur le **Schéma réactionnel 25**, tout comme les conditions synthétiques utilisées.

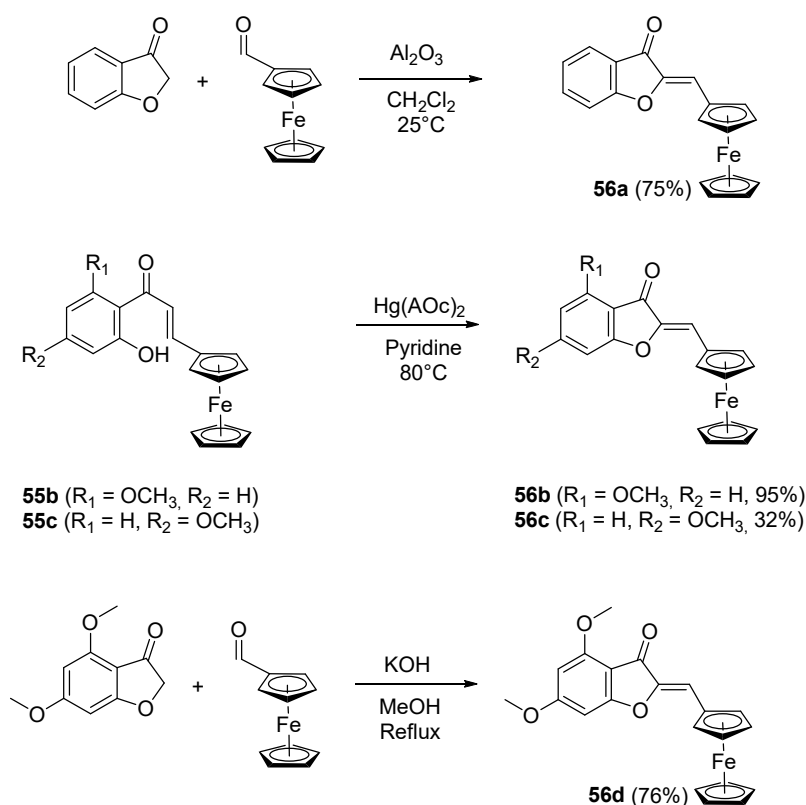


Schéma réactionnel 25 : Synthèse des aurones **56a** à **56d**.

Dans un premier temps a été synthétisée l'aurone ferrocénique ne possédant aucune substitution sur le cycle A (composé **56a**). Une première approche considérée fut une condensation aldolique entre la benzofuran-3(2H)-one commerciale et le ferrocène carboxaldéhyde en présence d'hydroxyde de potassium dans le méthanol à reflux. Malheureusement ces conditions ne nous ont pas permis d'obtenir le composé souhaité. Un second essai dans des conditions plus neutres, à l'aide d'oxyde d'aluminium dans le dichlorométhane à 25°C⁴⁴⁰ a permis la synthèse de l'aurone **56a** avec un rendement de 75%.

Pour la synthèse des composés **56b** et **56c**, les dérivés benzofuran-3(2H)-one correspondant n'étant pas disponibles, nous sommes partis des dérivés chalcones ferrocéniques **55b** et **55c** correspondants et nous nous sommes inspirés des travaux réalisés par l'équipe d'Hillard et Jaouen.⁴⁴¹ Les aurones ferrocéniques **56b** et **56c** ont ainsi pu être obtenues par traitement des chalcones correspondantes **55b** et **55c** avec de l'acétate de mercure (II) dans la pyridine à 80°C avec des rendements de 95% et 32%.

La 4,6-diméthoxybenzofuran-3(2H)-one étant disponible au sein du laboratoire, une condensation en milieu basique dans les conditions classiques avec le ferrocène

carboxaldéhyde a été réalisée et a permis d'obtenir le composé **56d** avec un rendement de 76%.

○ Synthèse des analogues aurones hydroxylées

Dans un second temps ont été synthétisés les analogues hydroxylés des aurones ferrocéniques. Plusieurs alternatives ont été testés afin d'obtenir ces composés. Le composé **57a** présentant un groupement hydroxyle en position 4 a été obtenu par déméthoxylation de l'aurone méthoxylée **56b** correspondante par action du chlorure d'aluminium dans le dichlorométhane à reflux mais avec un faible rendement (**Schéma réactionnel 26**).

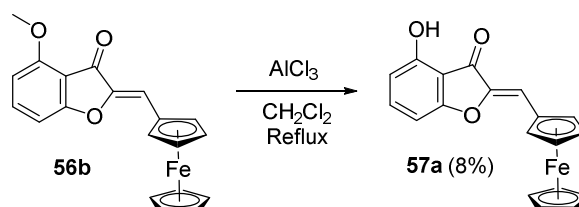


Schéma réactionnel 26 : Synthèse du dérivé **57a** par déméthoxylation de l'aurone **56b**.

Le rendement obtenu n'étant que de 8%, nous avons employé d'autres méthodes afin d'obtenir les aurones ferrocéniques hydroxylées souhaitées. Les benzofuranones hydroxylées correspondantes étant disponibles commercialement, une condensation en milieu basique, en présence d'hydroxyde de potassium dans le méthanol à reflux a été réalisée avec le ferrocène carboxaldéhyde afin d'obtenir les dérivés **57b** (hydroxylé en position 6) et **57c** (hydroxylé en position 4 et 6) (**Schéma réactionnel 27**). Bien que les rendements obtenus (respectivement 4 et 3%) sont inférieurs à celui obtenu précédemment, ces réactions nous ont tout de même permis d'obtenir une quantité suffisante de composés pour les tests biologiques.

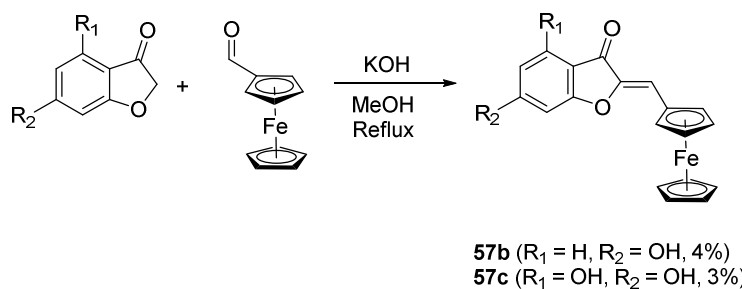


Schéma réactionnel 27 : Synthèse des composés **57b** et **57c** par condensation basique.

II.6.2.3 Synthèse des dérivés de flavones ferrocéniques

Dans un troisième temps, nous avons synthétisé la série des flavones ferrocéniques, ne possédant aucune substitution sur le cycle A, ainsi que les analogues méthoxylés en position 5 et/ou 7 (**Figure 117**).

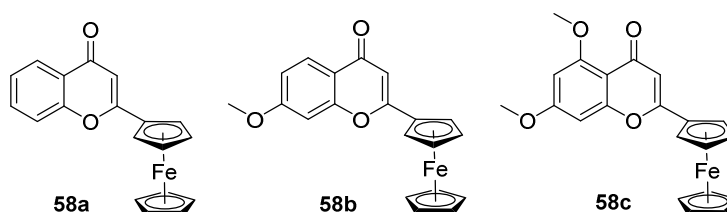


Figure 117 : Dérivés flavones ferrocéniques étudiés.

Afin de synthétiser ces composés, nous nous sommes appuyés sur la méthode mise au point par l'équipe d'Hillard et Jaouen⁴⁴¹ selon laquelle une isomérisation directe à partir d'aurones correspondantes en présence de cyanure de potassium dans l'éthanol à reflux⁴⁴² permet de conduire aux composés souhaités. Nous avons donc suivi cette procédure afin d'obtenir les dérivés flavones ferrocéniques souhaités **58a** à **58c** avec des rendements compris entre 15% et 57% (**Schéma réactionnel 28**).

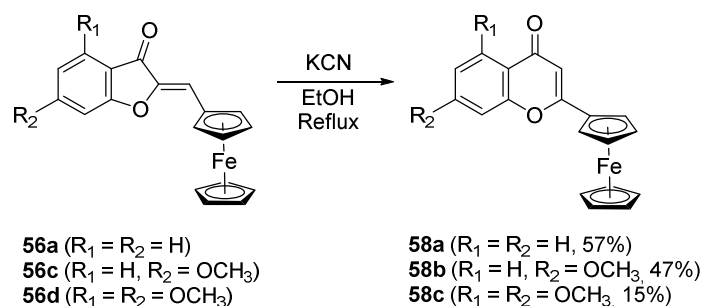


Schéma réactionnel 28 : Synthèse des dérivés flavones ferrocéniques.

Le mécanisme proposé par l'équipe d'Hillard et Jouen pour cette réaction est décrit dans le **Schéma réactionnel 29**.⁴⁴¹

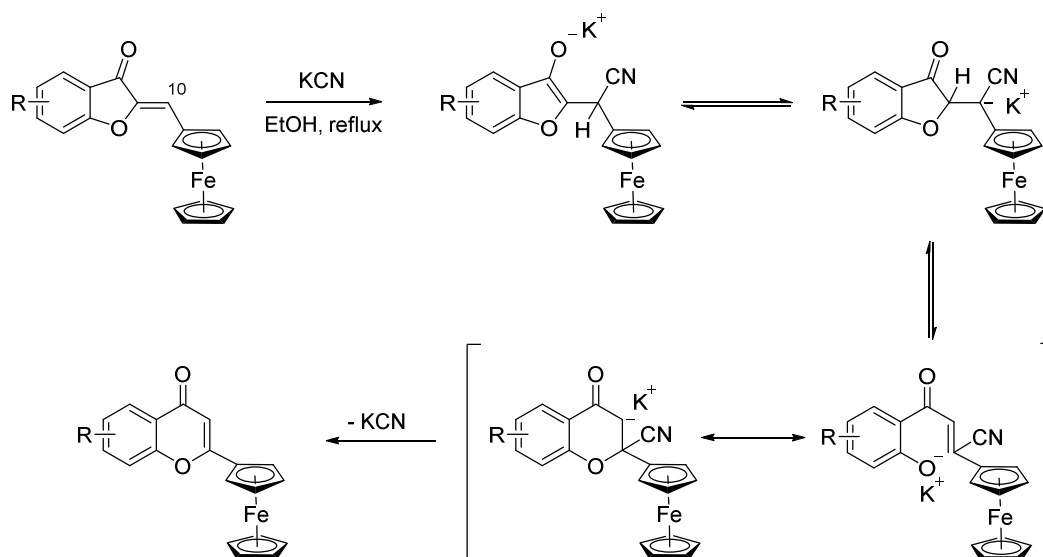


Schéma réactionnel 29 : Mécanisme proposé par l'équipe de Hillard et Jaouen pour la synthèse de flavones ferrocéniques à partir d'aurones ferrocéniques.⁴⁴¹

Le mécanisme d'isomérisation des aurones en flavones est fortement amélioré grâce à la présence du groupement ferrocène. En effet, d'après les travaux d'Hillard et Jaouen, on peut supposer que l'attaque de l'anion cyanure sur le carbone 10 génère une charge négative instable en cette position adjacente au ferrocène suite à une migration de proton. Cet anion instable se réarrange ensuite par une ouverture de cycle au niveau du phénolate. L'attaque du phénolate sur le carbone 10 et l'éjection du groupement cyanure permet d'obtenir la structure de la flavone.

Néanmoins, nous ne sommes pas parvenus à synthétiser *via* cette méthode le composé monométhoxylé en position 5. Ainsi, afin de tenter de trouver une voie de synthèse différente, mais également d'augmenter les rendements de cette étape, différents essais ont été tentés. Dans un premier temps, nous avons tenté d'optimiser la réaction en remplaçant le cyanure de potassium par un analogue, le cyanure de triméthylsilyle, mais sans succès. Nous avons également utilisé, en plus du cyanure de potassium, un éther couronne afin de chélater le cation K^+ pour exalter la réactivité de l'ion CN^- . Mais une fois de plus, nous n'avons observé aucune réaction. Une autre méthode, décrite également par l'équipe d'Hillard et Jouen, suggère le traitement d'aurones ferrocéniques par la *N,N*-diisopropylamidure de lithium dans le THF afin de former une ynone intermédiaire.⁴⁴¹ En effet, la déprotonation du proton vinylique conduit à la formation d'un anion, fortement déstabilisé par le ferrocène. Suite à un rapide réarrangement et une ouverture de cycle, l'ynone se forme. Puis le traitement de cet

intermédiaire avec de l'éthanolate de sodium dans l'éthanol à température ambiante conduit à la formation majoritaire de la flavone ferrocénique (**Schéma réactionnel 30**).

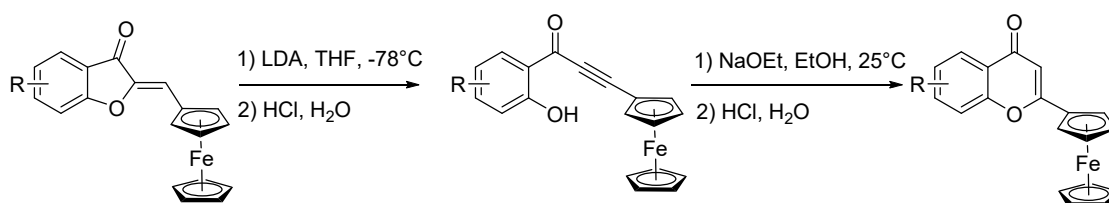


Schéma réactionnel 30 : Voie de synthèse des flavones ferrocéniques *via* la formation d'une ynone intermédiaire.⁴⁴¹

Cependant, une fois de plus, nous ne sommes pas parvenus à obtenir la flavone. Nous avons également tenté de transformer directement les chalcones ferrocéniques en flavone, par l'utilisation de diiode dans le DMSO ou de dioxyde de sélénium dans le dioxane mais sans succès. Il sera ainsi nécessaire pour la suite de ce projet de trouver d'autres conditions afin de synthétiser ce composé intéressant et de le tester biologiquement.

II.6.3. Évaluation biologique des dérivés ferrocéniques de flavonoïdes

L'ensemble des dérivés ferrocéniques a été testé dans un premier temps pour leur capacité à induire un efflux massif de GSH sur les cellules contrôles BHK-21wt et les cellules BHK-21-MRP1, surexprimant MRP1. Les résultats sont résumés dans le **Tableau 36** et sur la **Figure 118**.

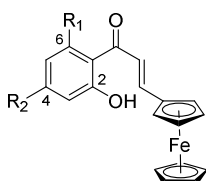
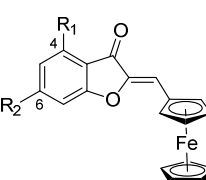
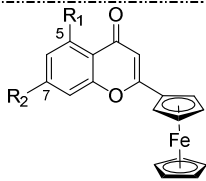
	Référence	R ₁	R ₂	% Efflux net GSH	
				5 μ M	20 μ M
	Vérapamil RS	/	/	66,1	96,8
	55a	H	H	20 \pm 2	76 \pm 11
	55b	OCH ₃	/	17 \pm 5	31 \pm 5
	55c	/	OCH ₃	22 \pm 7	67 \pm 6
	55d	OCH ₃	OCH ₃	2 \pm 1	19 \pm 3
	56a	/	/	16 \pm 2	55 \pm 4
	56b	OCH ₃	/	52 \pm 7	73 \pm 11
	56c	/	OCH ₃	7 \pm 3	46 \pm 14
	56d	OCH ₃	OCH ₃	49 \pm 0	60 \pm 5
	57a	OH	/	24 \pm 5	53 \pm 9
	57b	/	OH	26 \pm 8	21 \pm 9
	57c	OH	OH	9 \pm 9	12 \pm 7
	58a	/	/	21 \pm 5	64 \pm 6
	58b	/	OCH ₃	61 \pm 9	61 \pm 4
	58c	OCH ₃	OCH ₃	28 \pm 11	51 \pm 9

Tableau 36 : Efflux net de GSH sur les cellules BHK-21. Expériences réalisées en triplicata.

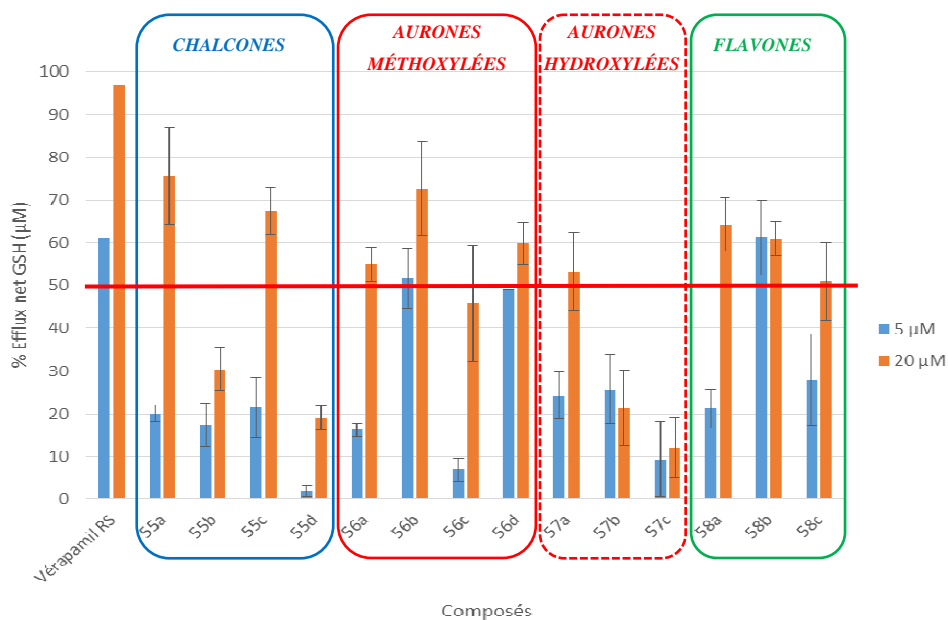


Figure 118 : Diagramme représentant les efflux net de GSH des dérivés ferrocéniques testés à 5 (bleue) et 20 μ M (orange). Ces résultats sont exprimés en % d'efflux net de GSH. Les valeurs représentent la moyenne \pm la déviation standard sur un minimum de trois expériences indépendantes.

CHAPITRE 3. MODULATION DE LA PROTÉINE MRP1

A 5 μ M, les composés les plus actifs semblent être l'aurone **56b** méthoxylée en position 4 (52%), l'aurone 4,6-diméthoxylée **56d** (49%) et la flavone 7-méthoxylée **58b** (61%) avec des pourcentages d'efflux équivalents au vérapamil.

A 20 μ M, les chalcones **55a** (76%) et **55c** (67%), les aurones **56a** (55%), **56b** (73%) et **56d** (60%) non hydroxylées, l'aurone **57a** hydroxylée en position 4 (53%) et les flavones **58a** (64%), **58b** (61%) et **58c** (51%) présentent des efflux nets de GSH proches ou supérieurs à 50%.

On remarque clairement que les aurones méthoxylées présentent une activité d'efflux de GSH plus importante que les aurones hydroxylées. En effet, **56b** est 2,1 et 1,4 fois plus actif que **57a** respectivement à 5 et à 20 μ M. Bien que 3,7 fois plus actif que son analogue méthoxylé **56c** à 5 μ M, le composé hydroxylé **57b** est 2,2 moins actif à 20 μ M. Pour finir **57c**, un analogue hydroxylé est 5,3 et 5 fois moins actif que **56d** respectivement à 5 et à 20 μ M. Ainsi on peut conclure que la méthoxylation en R₁ et R₂ semble plus favorable pour l'activité d'efflux de GSH, la stabilité des composés hydroxylés pouvant être mise en cause.

On peut ainsi en déduire qu'à 20 μ M certains analogues chalcones, aurones méthoxylées ou nues ainsi que les flavones méthoxylées sont de meilleurs inducteurs d'efflux de GSH que les aurones hydroxylées et constituent ainsi des meilleurs candidats pour les tests de sensibilité collatérale.

Sur ces quatorze dérivés, les neuf composés présentant un efflux net de GSH supérieur à 50% à 20 μ M ont été soumis au test de survie cellulaire afin d'étudier leur profil de sensibilité collatérale. La cytotoxicité de ces analogues a été évaluée grâce au test MTT sur les cellules sensibles (NCI-H69) et les cellules résistantes surexprimant MRP1 (H69AR). Les valeurs des EC₅₀ correspondantes sont rassemblées dans le **Tableau 37**.

CHAPITRE 3. MODULATION DE LA PROTÉINE MRP1

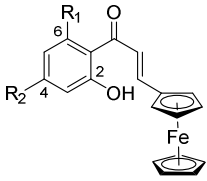
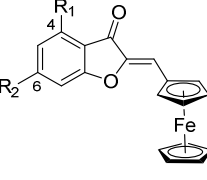
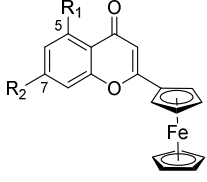
Structure	Référence	R ₁	R ₂	EC ₅₀ (μM)		RS
				NCI-H69	H69AR	
	Vérapamil RS	/	/	>100 μM	6,7	>14,8
	55a	H	H	e.c.	e.c.	/
	55c	H	OCH ₃	e.c.	e.c.	/
	56a	H	H	2,6	23,5	0,1
	56b	OCH ₃	H	12,5	10,0	1,2
	56d	OCH ₃	OCH ₃	10,4	8,7	1,2
	57a	OH	H	55,0	55,0	1,0
	58a	H	H	3,6	13,6	0,3
	58b	H	OCH₃	53,0	7,0	7,6
	58c	OCH₃	OCH₃	54,0	8,7	6,2

Tableau 37 : Cytotoxicité des composés sur les cellules H69AR surexprimant MRP1 et les cellules contrôles NCI-H69. Les valeurs des EC₅₀ (concentration requises pour obtenir 50% de l'effet maximal) ont été calculées à partir de courbes doses-réponses. RS est le rapport de sélectivité. Les valeurs représentent la moyenne ± la déviation standard sur un minimum de trois expériences indépendantes. e.c. = étude en cours d'évaluation biologique.

D'après ces résultats de survie cellulaire, les composés **58b** et **58c** sont les seuls à induire une sensibilité collatérale. En effet, ils présentent respectivement des ratios sélectifs de 7,6 et 6,2 (**Figure 119**).

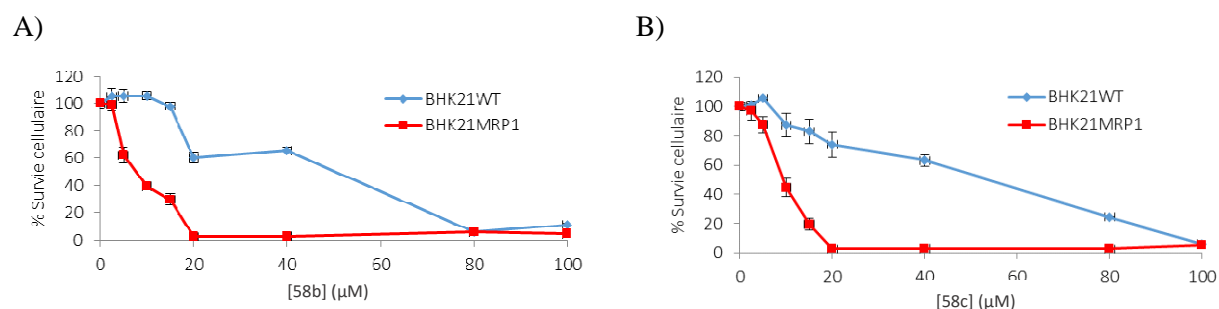


Figure 119 : Courbes représentant l'évolution de la survie cellulaire en fonction de la concentration en composés **58b** (A) et **58c** (B) sur les cellules BHK-21wt (contrôles) et BHK-21-MRP1 (résistantes).

Au contraire les composés **56b**, **56d** et **57a**, intéressants en efflux de GSH, n'induisent aucune sensibilité collatérale, présentant des ratios autour de 1 et 1,2. Les composés **56a** et **58a** quant à eux induisent préférentiellement une mort cellulaire des cellules contrôles et non des cellules résistantes. Dans ce cas de figure, on suppose que ses composés sont transportés par MRP1, protégeant ainsi la cellule de leurs effets. Les études de sensibilité collatérale des composés **55a** et **55c** sont actuellement en cours.

Les dérivés de flavones méthoxylés sont ainsi les seuls capables d'induire une sensibilité collatérale. Le groupement méthoxy sera donc retenu comme un élément structural important.

II.6.4. Perspectives

Parmi les composés synthétisés, les flavones ferrocéniques méthoxylés semblent être les meilleurs candidats, capables d'effluer massivement le glutathion cellulaire mais également d'induire une sensibilité collatérale. L'étude biologique de ces composés sera donc poursuivie.

L'étude de différents flavonoïdes a d'ores et déjà montré que la présence d'un groupement méthoxy en position 3 de la flavone est très favorable à la sensibilité collatérale. Il sera ainsi intéressant de synthétiser à l'avenir les analogues flavones ferrocéniques présentant un groupement méthoxy en position 3 (**Figure 120**).

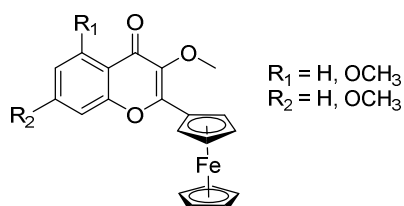


Figure 120 : Futurs analogues à synthétiser.

Par ailleurs et comme indiqué dans l'introduction de ce chapitre, nous avons entrepris une étude approfondie afin de faire la lumière sur le potentiel antioxydant/prooxydant des composés testés. Une partie du travail a déjà été réalisé à l'Université de Genève dans le cadre de ma co-tutelle. Les travaux déjà réalisés et obtenus restent au stade préliminaire et vont se poursuivre. Ainsi, nous avons jugé trop prématuré de présenter ces travaux dans ce manuscrit de thèse.

III. Conclusion du chapitre 3

Ce travail a consisté en la conception, la synthèse et l'évaluation biologique de nouveaux modulateurs de la protéine MRP1, inducteurs de sensibilité collatérale *via* un efflux massif de GSH hors des cellules cancéreuses surexprimant la protéine étudiée. Bien que les modulations portant sur les dimères de flavonoïdes et la position 3 de la flavone n'aient pas conduit à de résultats concluants, l'introduction d'un motif ferrocène à la place du cycle B de la flavone semble être prometteuse et il sera ainsi intéressant de poursuivre l'étude de cette pharmacomodulation.

De plus, nous avons pu remarquer que certains composés, capables d'induire un efflux massif de GSH, ne conduisaient pas à une sensibilité collatérale. En effet, il semblerait que l'efflux de GSH soit une condition nécessaire mais non suffisante pour l'induction de mort cellulaire sélective. Ainsi, nous pouvons supposer l'existence de différentes cibles, la première étant MRP1 et conduisant à un efflux massif de GSH, tandis que d'autres cibles, impliquant d'éventuelles routes variées, conduiraient à la mort sélective par apoptose uniquement si les cellules sont dépourvues de GSH. L'implication d'autres voies cellulaires dans l'induction sélective d'apoptose reste ainsi encore à étudier.

Ma participation à ce projet fait l'objet d'un article dans le journal *Biochemical Pharmacology*.⁴⁰³

CHAPITRE 4.

SYNTHÈSE BIOMIMÉTIQUE DU TRAMADOL

Avant-propos

Suite à la publication en 2013 dans le journal *Angewandte Chemie International Edition*⁴⁴³ de la découverte du tramadol dans les racines d'un arbuste africain, *Nauclea latifolia*, il était important pour le laboratoire d'étudier ensuite l'origine naturelle de cette molécule au sein de la plante. Ainsi, en parallèle à mon sujet principal de thèse s'articulant autour des transporteurs ABC et du traitement de la chimiorésistance, j'ai eu l'opportunité de poursuivre les travaux entrepris par le Dr. Romain Haudecoeur au sein du laboratoire et portant sur la synthèse biomimétique du tramadol. Ce travail m'a permis de m'intéresser à un nouveau projet, de travailler sur d'autres structures moléculaires et d'aborder un tout autre aspect, la synthèse biomimétique.

Ce projet fut réalisé en collaboration avec le Dr. Richard Robins de l'Université de Nantes, le Dr. Thierry Lomberget de l'Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université de Lyon 1 et le Pr. Jean-Luc Wolfender de la Section des Sciences Pharmaceutiques de l'Université de Genève.

I. Le tramadol et *Nauclea latifolia*

I.1. LE TRAMADOL, UTILISATION ET ACTIVITÉS BIOLOGIQUES

Le tramadol ou (1*RS*, 2*RS*)-2-[(diméthylamino)méthyl]-1-(3-méthoxyphényl)cyclohexanol est un analgésique opioïde synthétique, développé originellement par la compagnie Grünenthal GmbH dans les années 1970, commercialisé en Allemagne en 1977 puis approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) en 1995 pour le traitement de la douleur, modérée à sévère. Ce composé est commercialisé sous sa forme pure notamment sous les marques Contramal®, Topalgic® ou encore Ixprim® dans lequel il est associé au paracétamol.

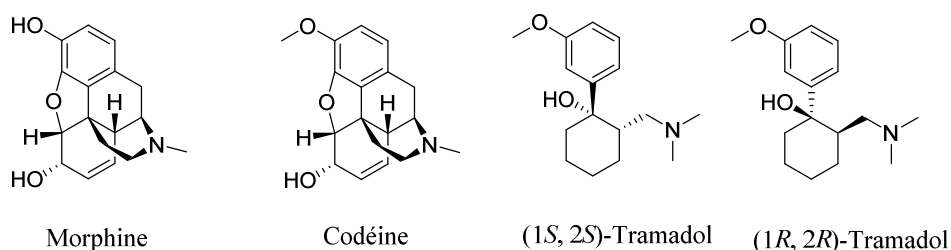


Figure 121 : Structures de la morphine, de la codéine ainsi que des deux énantiomères de la base libre du (1*RS*, 2*RS*)-tramadol.

Conçu par simplification moléculaire de la codéine et de la morphine (**Figure 121**), le tramadol possède des activités opioïdes agonistes mais également une action sur les systèmes mono-aminergiques avec inhibition de la recapture de la noradrénaline et de la sérotonine. Cette double activité est responsable de l'effet antidouleur du tramadol.

Le tramadol est commercialisé sous la forme d'un mélange racémique contenant les énantiomères (1*R*, 2*R*)-(+)-Tramadol et (1*S*, 2*S*)-(-)-Tramadol. Ces deux énantiomères présentent une activité analgésique mais *via* des mécanismes d'action différents. L'énantiomère (+) dextrogyre agit spécifiquement sur les récepteurs opioïdes μ et sur

l'inhibition de la recapture de la 5-hydroxytryptamine. L'énantiomère (-) lévogyre inhibe quant à lui la recapture de la noradrénaline⁴⁴⁴ tout en favorisant sa sécrétion et améliore ainsi les effets inhibiteurs sur la transmission de la douleur dans la moelle épinière. L'action synergique de ces deux énantiomères permet ainsi l'effet analgésique attendu par le tramadol.⁴⁴⁵⁻⁴⁴⁷

Le tramadol est fortement métabolisé dans le foie par le cytochrome P450 2D6 conduisant à la formation de *O*-déméthyltramadol (M1) et par les cytochromes P450 2B6 et P450 3A4 conduisant à la formation du *N*-déméthyltramadol (M2). Il est également métabolisé en trois métabolites secondaires, le *N, N*- didéméthyltramadol, le *N, N, O*-tridéméthyltramadol et le *N, O*-déméthyltramadol.

L'affinité du tramadol pour le récepteur opioïde μ est très faible, environ 6000 fois inférieure à celle de la morphine. Cependant, son métabolite *O*-déméthyltramadol (M1) présente une affinité pour les récepteurs opioïdes μ environ 200 fois supérieure à celle du tramadol parental.⁴⁴⁸⁻⁴⁵⁰

Le tramadol est utilisé par voie orale, parentérale ou rectale pour des doses comprises entre 50 et 100 mg. Après une administration orale, le tramadol est rapidement et complètement absorbé. Les comprimés à libération prolongée libèrent le principe actif sur une période de 12 heures, atteignant la concentration maximale de libération après 4,9 heures et présentent une biodisponibilité de 87-95% en comparaison aux capsules. Le tramadol ainsi que l'ensemble de ses métabolites sont conjugués à l'acide glucuronique avant leur excrétion par les reins. La durée de demi-vie moyenne est d'environ 6 heures.

L'utilisation de tramadol entraîne l'apparition de certains effets secondaires tels que des vertiges, des nausées, de la somnolence, des vomissements et des céphalées. Contrairement aux autres opiacés, le tramadol présente un risque faible de détresse respiratoire aux doses thérapeutiques. De plus, en raison de sa faible affinité avec les récepteurs opioïdes, les risques de pharmacodépendances sont amoindris.^{451, 452} Le tramadol présente également des effets antidépresseurs,⁴⁵³ et est utilisé pour le traitement des troubles psychiatriques, de l'anxiété⁴⁵⁴ et de l'éjaculation précoce.⁴⁵⁵

I.2. NAUCLEA LATIFOLIA, UNE PLANTE AUX MILLE VERTUS

Nauclea Latifolia Smith, connu sous le nom de pécher africain, est un arbuste de la famille des rubiacées abondamment répandu dans toute l'Afrique tropicale. Il peut pousser jusqu'à 200 mètres d'altitude et atteindre 5 mètres de hauteur (**Figure 122**).

Riches en produits phytochimiques tels que des alcaloïdes, des résines, des saponines, des tannins, des anthraquinones ou encore des flavonoïdes, cette plante est utilisée depuis longtemps en médecine traditionnelle en Afrique de l'Est et de l'Ouest afin de soigner un grand nombre de pathologies.



Figure 122 : Photographie de l'arbuste *Nauclea Latifolia* à gauche, et de sa fleur à droite.

De nombreuses études biologiques *in vitro* et *in vivo* ont été réalisées à partir de multiples extraits de différentes parties de *Nauclea latifolia* afin de justifier l'utilisation de cette plante en médecine traditionnelle, de comprendre ses mécanismes d'action et d'isoler les principes actifs responsables de ses activités biologiques.

I.2.1. Activités antiplasmodiales

Des extraits aqueux de *Nauclea latifolia* ont été testés sur une souche sensible et une souche résistante à la chloroquine de *Plasmodium falciparum*, parasite causant le paludisme chez l'homme. Les extraits ont été obtenus à partir du tronc et des racines de la plante et ont été testés sous forme d'infusion et de décoction. Les valeurs des IC_{50} obtenues, comprises entre 0,6 et 7,5 $\mu\text{g/mL}$, se sont révélées être similaires à celles observées chez deux autres plantes, *Artemisia annua* (3,9 $\mu\text{g/mL}$) et *Azadirachta indica* (2,35-12,5 $\mu\text{g/mL}$), largement utilisées en médecine traditionnelle pour le traitement de la malaria. Les IC_{50} observées sont similaires pour les extraits infusés et les extraits décoctés ainsi que pour les deux souches de *Plasmodium falciparum* étudiées. Cependant, des différences ont été observées pour deux lots de *Nauclea latifolia* récoltés à deux saisons différentes, l'un en septembre juste après la saison sèche et l'autre en janvier lors de la période de sécheresse. Les variations climatiques ainsi que la disponibilité de l'eau peuvent expliquer l'origine de cette différence. En effet, en

période humide par exemple, les plantes sont capables d'absorber de l'eau afin de pousser rapidement et d'emmagasinier une quantité plus importante de principes antiplasmodiaux. Pour finir, les extraits issus du tronc semblent être plus actifs que les extraits issus des racines.⁴⁵⁶ Cependant, d'autres études ont mis en évidence qu'une fraction des alcaloïdes présents dans la plante et responsables de l'activité antimalariale présenterait des propriétés génotoxiques et mutagènes bien qu'aucun cas de toxicité n'ai été relevé suite à l'utilisation du *Nauclea latifolia*.⁴⁵⁷ En médecine traditionnelle, *Nauclea latifolia* peut être associé à d'autres plantes dans le traitement des fièvres paludiques. La co-administration de *Nauclea latifolia* avec *Artocarpus altilis*, *Murraya koenigii* ou encore *Enantia chlorantha* améliore significativement l'activité antiplasmodiale par rapport aux plantes seules, indiquant ainsi un synergisme de leurs activités respectives.⁴⁵⁸ Ainsi l'association avec d'autres plantes permettrait de moduler l'activité antipaludique mais également la toxicité générée par les alcaloïdes de *Nauclea latifolia*.

I.2.2. Activités anthelminthiques

Plusieurs études sur les nématodes parasites ont démontré une activité anthelminthique de *Nauclea latifolia*. La plante sous forme d'extraits 50% aqueux/ 50% méthanol a démontré une activité inhibitrice de la glutathion S-transférase (GST), enzyme dont l'action permettrait de protéger le parasite d'agents cytotoxiques par une attaque membranaire des espèces réactives de l'oxygène. La présence de proanthocyanidines, polyphénols au pouvoir antioxydant, pourrait être responsable de cette activité antiparasitaire.⁴⁵⁹ L'efficacité anthelminthique *in vivo* de *Nauclea latifolia* chez des moutons cliniquement infestés par des nématodes gastro-intestinaux a été évaluée en mesurant la quantité d'œufs de nématodes présente dans les excréments des animaux. Après cinq jours de traitement à l'aide d'une dose de 1,6 g/kg d'extrait de *Nauclea latifolia*, le nombre d'œufs générés a diminué de 93,8%, soit de manière équivalente à une dose unique de 5 mg/kg d'albendazole, antiparasitaire de référence (94,1%). La suppression de la production d'œufs par l'extrait suggère un effet inhibiteur sur la synthèse protéique des parasites.⁴⁶⁰ De plus, les extraits éthanoliques de *Nauclea latifolia* présentent une activité anthelminthique supérieure aux extraits aqueux.⁴⁶¹

I.2.3. Activités antibactériennes

Des extraits méthanoliques de feuilles et écorces du tronc de *Nauclea latifolia* ont démontré une large zone d'inhibition de la prolifération bactérienne sur des souches Gram positives telles que *Staphylococcus aureus* (Concentration minimale inhibitrice (CMI) = 64 µg/mL) et Gram négative telles que *Pseudomonas aeruginosa* (CMI = 64 µg/mL). De plus, une CMI de 2 µg/mL a été observée contre la levure *Candida albicans*, démontrant ainsi une activité anticandidale.⁴⁶² Une nouvelle fois, les extraits éthanoliques présentent des activités antibactériennes contre un plus large spectre de souches bactériennes (9 souches sur 11) que les extraits dans l'eau froide (3 souches sur 11) ou dans l'eau chaude (aucune souche).⁴⁶³

I.2.4. Activités hypoglycémique et hypocholestérolémique

Différentes parties de *Nauclea latifolia* sont prescrites en médecine traditionnelle comme remède contre le diabète. L'administration d'extraits aqueux des feuilles de la plante (200 mg/kg) permet de réduire de 45% le niveau sanguin de glucose chez des rats diabétiques sur une période de 4 h après l'administration de la plante. Le traitement de rats non diabétiques dans les mêmes conditions ne présente, au contraire, aucune activité hypoglycémique. Cette activité est différente pour le glibenclamide, médicament antidiabétique de référence, entraînant une diminution du niveau sanguin de glucose chez les rats diabétiques et chez les rats sains.⁴⁶⁴ Un comportement similaire est observé pour les extraits éthanoliques de feuilles de *Nauclea latifolia* (400 mg/kg) capables de diminuer le taux de glucose sanguin de 36,9% chez les rats diabétiques et de 30,9% chez les rats normaux. Les extraits de la plante dans l'hexane quant à eux ne présentent aucune activité hypoglycémique.⁴⁶⁵ De plus, des extraits butanoliques du tronc et des racines de *Nauclea latifolia* se sont avérés être de bons candidats pour le traitement du diabète pendant une grossesse.⁴⁶⁶ Certaines plantes, connues pour leurs propriétés antidiabétiques, sont de bonnes sources d'agents antioxydants. C'est le cas des fruits et des feuilles de *Nauclea latifolia*, présentant des propriétés antioxydantes mise en évidence lors de différents tests classiques et corrélées à la présence de polyphénols, de flavanols et de flavonols.⁴⁶⁷ En plus de ses activités hypoglycémiques, des extraits méthanoliques de fruits de *Nauclea latifolia* présentent une activité hypocholestérolémique. En effet, une réduction du cholestérol sanguin de 136,25 à 100,76 mg/dL a été observée chez

des rats nourris avec 40% des fruits de la plante en complément alimentaire. La présence de saponines pourrait expliquer cette activité hypocholestérolémique.⁴⁶⁸

I.2.5. Activités neuropharmacologiques

De fortes doses d'extraits aqueux de l'écorce des racines de la plante (50-200 mg/kg) présentent des propriétés sédatives. En effet, une diminution de l'activité motrice a été observée chez des souris lors du test d'activité motrice spontanée, test permettant de mesurer le niveau d'excitabilité du système nerveux central. De plus ces extraits atténuent le comportement exploratoire indiquant une activité sédative.⁴⁶⁹ Ils sont également capables d'augmenter la durée du sommeil induit par du diazépam indiquant une activité dépresseur du système nerveux central.^{469, 470} Cette activité aurait pour origine une interférence avec la neurotransmission dopaminergique centrale, due à la présence de saponines, présentes en abondance dans la plante.⁴⁶⁹ D'autres études ont démontré une activité antidépresseur des écorces de racines de *Nauclea latifolia* comparable à la fluoxétine, agent antidépresseur de référence, ainsi que des propriétés myorelaxantes. Les activités de l'arbuste semblent être corrélées à une augmentation de la concentration des récepteurs GABA et/ou à la modulation des niveaux sérotoninergiques au sein du système nerveux central.⁴⁷¹ L'utilisation des racines de *Nauclea latifolia* dans les traitements de la fièvre, de la malaria, de l'insomnie, de l'anxiété et de l'épilepsie peut s'expliquer également par ses activités anticonvulsive, antiépileptique et sédative. De plus, la plante semble posséder une activité anxiolytique proche du diazépam à forte dose, associée à une activité antipyrétique.⁴⁷⁰ Cette dernière activité semble également être caractéristique des feuilles de *Nauclea latifolia* où elle s'accompagne d'une activité anti-inflammatoire. En effet, l'extrait de feuilles, tout comme l'extrait de racines, est capable d'inhiber l'augmentation d'un œdème de pied induit chez le rat.⁴⁷² *Nauclea latifolia* présente ainsi un large panel d'activités neuropharmacologiques auxquelles viennent s'ajouter des propriétés antinociceptives décrites dans le paragraphe suivant et justifiant ainsi son utilisation en médecine traditionnelle en Afrique de l'Ouest.

I.2.6. Activités antinociceptives

Les décoctions des racines de *Nauclea latifolia* ont démontré des activités antinociceptives significatives sur différents modèles animaux classiques de la douleur.^{473, 474} *Nauclea latifolia*

a été testé dans un modèle de douleur tonique, le test à la formaline. Ce test consiste à injecter une solution diluée de formaline dans la patte arrière de la souris, provoquant une réponse nociceptive en deux phases : une première phase neurogénique ou aiguë (de 0 à 5 minutes) au cours de laquelle est libérée la substance P puis une phase intermédiaire d'inhibition active suivie d'une seconde phase inflammatoire (15 à 30 minutes). Le traitement des souris à l'aide de *Nauclea latifolia* produit une très nette inhibition dose-dépendante de la douleur induite par la formaline. L'effet analgésique de l'extrait de la plante à une dose de 160 mg/kg est efficace lors de la première et de la seconde phase (respectivement 60,7% et 64,2% d'inhibition), tout comme 5 mg/kg de morphine (respectivement 64,8% et 73,1% d'inhibition). De plus, un prétraitement avec la naloxone (2 mg/kg), antagoniste non spécifique des récepteurs opioïdes, inverse complètement l'effet antinociceptif de la décoction de *Nauclea latifolia*.

Le modèle de la plaque chaude a également été employé, modèle au cours duquel l'animal est placé sur une plaque métallique chauffée brusquement ou graduellement. On mesure alors le temps d'apparition de réponses comportementales de l'animal qui se lèche, se secoue les pattes et/ou saute. Les comportements de léchage sont associés à une activité réflexe tandis que les sauts correspondent à une réponse intégrée au niveau supraspinal. Les décoctions de *Nauclea latifolia* (160 mg/kg) protègent la souris de la chaleur pendant un temps maximal de $56,1 \pm 3,9$ minutes, 3 heures après l'injection de la plante. La morphine (5 mg/kg) protège la souris pendant $62,7 \pm 1,9$ minutes après 4 heures.

Le test de retrait de la queue (*tail-flick test*) est un test au cours duquel la queue de l'animal est immergée dans de l'eau chaude dont la température augmente progressivement. On mesure le temps que met l'animal pour retirer sa queue. Cette méthode permet de mesurer un réflexe nociceptif spinal. 60 minutes après l'injection de 160 mg/kg de *Nauclea latifolia*, on peut observer une augmentation du temps de retrait de la queue ($8,0 \pm 0,3$ minutes), semblable à 5 mg/kg de morphine ($8,1 \pm 0,5$ minutes). Pour finir, les souris ont été soumises au test de contractions abdominales par injection d'acide acétique au cours duquel est mesuré le nombre de contractions abdominales et d'étirements du corps. L'effet antinociceptif observé fut dose-dépendant avec un maximum atteint pour 160 mg/kg de la plante et une protection observée de 61,7% comparable à la morphine (66,2%).⁴⁷³ Pour finir, des fractions alcaloïdes de *Nauclea latifolia* se sont révélées présenter des effets antiallodynique et antihyperalgésique sur un modèle de douleur neuropathique chez le rat.⁴⁷⁵

I.2.7. Activités antivirales

Des racines de *Nauclea latifolia* se sont révélées présenter une activité antivirale, inhibant des souches HSV-2 (Herpes simple virus de type 2) sensibles et résistantes à l'acyclovir avec des IC₅₀ respectivement équivalentes à 5,38 µg/mL et 7,17 µg/mL.⁴⁷⁶ De plus, les propriétés antivirales de *Nauclea latifolia* ont été étudiées sur des œufs d'embryons de poules atteints du virus de la maladie de Newcastle, maladie touchant les oiseaux et en particulier les volailles domestiques. Les extraits des fruits de la plante sont toxiques pour des concentrations de 50 et 100 mg/œufs pour les extraits éthanoliques et 100 mg/œufs pour les extraits aqueux. Cependant, à une concentration de 12,5 mg/œufs, les extraits éthanoliques et les extraits aqueux des feuilles de la plante sont capables d'induire une réduction virale d'environ 98,4% et 95% respectivement.⁴⁷⁷

I.2.8. Activités antipyrétiques

Nauclea latifolia fut également utilisé en médecine traditionnelle pour son activité antipyrétique, c'est-à-dire contre le symptôme de la fièvre. L'administration de la décoction de racines de *Nauclea latifolia* conduit à une altération de la température rectale de souris testées. En effet, alors que les souris contrôles auxquelles a été injectée de l'eau distillée ne présentent aucun changement de température corporelle, les souris tests auxquelles ont été injectées des doses de 80 et 160 mg/kg de la plante présentent une diminution de leur température corporelle 1 heure, 2 heures et 3 heures après l'administration. Après 24 heures, les températures reprennent une valeur normale. Un test antipyrétique a également été entrepris, consistant à induire une fièvre par injection d'une suspension de levure de bière (20 mg/kg) sous-cutanée au niveau de la nuque. 18 heures après l'injection de la levure, les souris sont traitées avec une décoction de racines de *Nauclea latifolia* et les températures rectales sont prélevées 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 et 6 heures après l'administration de la plante. Les données obtenues ont révélé que 160 mg/kg de la décoction de *Nauclea latifolia* permettent une réduction significative de la température corporelle 1 heure après l'administration de la plante. Si l'on compare l'effet de la plante (160 mg/kg) avec le composé de référence, l'acide acétylsalicylique, on observe respectivement une diminution de la fièvre au bout d'1 heure de 0,8 °C et de 0,5 °C.^{473, 474}

I.3. COMPOSÉS EXTRAITS DE *NAUCLEA LATIFOLIA*

Du fait de son utilisation en médecine traditionnelle ainsi que ses différentes activités biologiques, *Nauclea latifolia* représente une source naturelle de substances pharmacologiques actives. En effet, diverses analyses phytochimiques ont détecté la présence en fortes concentrations de saponines, d'alcaloïdes, de carbohydrates, de tannins, de résines mais également d'anthraquinones, de flavonoïdes, de dérivés de la quinone, de glycosides et de phénols. En 1975 ont été isolés de l'écorce de la racine plusieurs alcaloïdes de structure indoloquinolizidine. Parmi eux, deux sont identiques à l'angustine et à l'angustoline puis deux nouveaux composés ont été isolés : la nauléfine et la nauléline (**Figure 123**).⁴⁷⁸

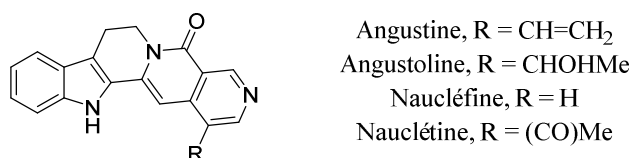


Figure 123 : Structures de l'angustine, de l'angustoline, de la nauléfine et de la nauléline, isolés à partir de l'écorce de la racine du *Nauclea latifolia*.

En 2003, cinq nouveaux composés issus de la même famille sont isolés et caractérisés au sein de l'écorce et du bois de *Nauclea latifolia*, les nauléamides A à E, ainsi que d'autres alcaloïdes indoloquinolizidines tels que la strictosamide, la 10-hydroxystictosamide et la tétrahydrodésoxycordifoline. Ces nauléamides peuvent dériver biosynthétiquement de la strictosamide, par une ouverture réductrice et/ou oxydante du cycle E (**Figure 124**).⁴⁷⁹

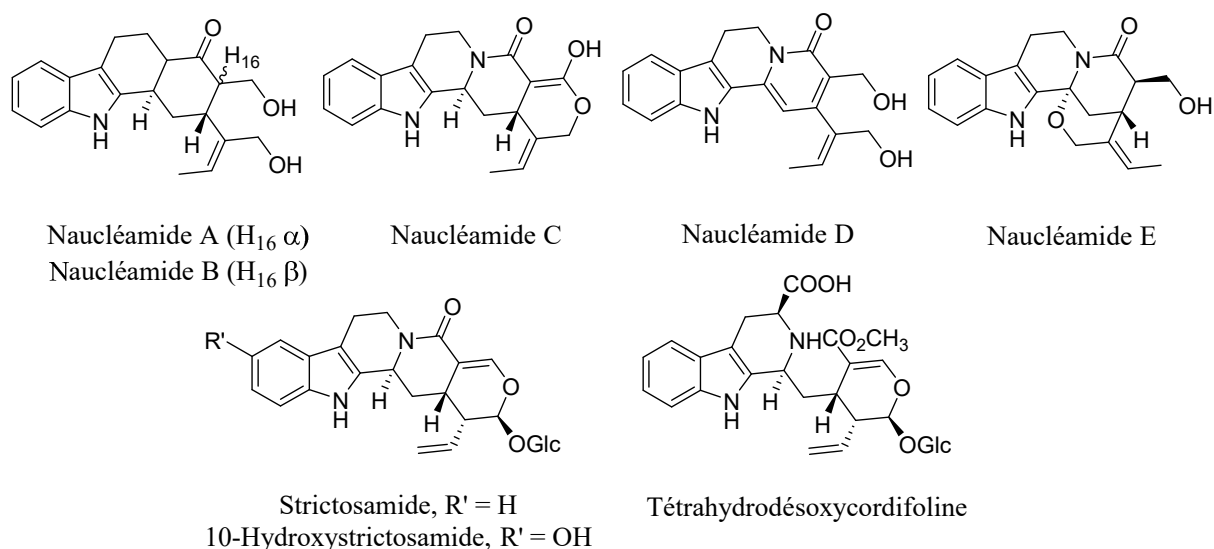


Figure 124 : Structures des nacléamides A à E, de la strictosamide, de la 10-hydroxystictosamide et de la tétrahydrodésoxycordifoline, isolés de l'écorce et du bois de *Nauclea latifolia*.

La même année sont isolés un nouvel alcaloïde, la nacléfolinine ainsi que cinq composés triterpénoïques : l'acide rotundique, l'acide α -L-rhamnoquinovique, le 3-*O*- β -D-glucopyranosyl- β -sitostérol, le squalène et le sitostérol-3-*O*-6'-stéaroyl- β -D-glucopyranoside.⁴⁸⁰ En 2009 est isolé un nouvel alcaloïde indoloquinolizidine, le nacléamide F (**Figure 125**).⁴⁸¹

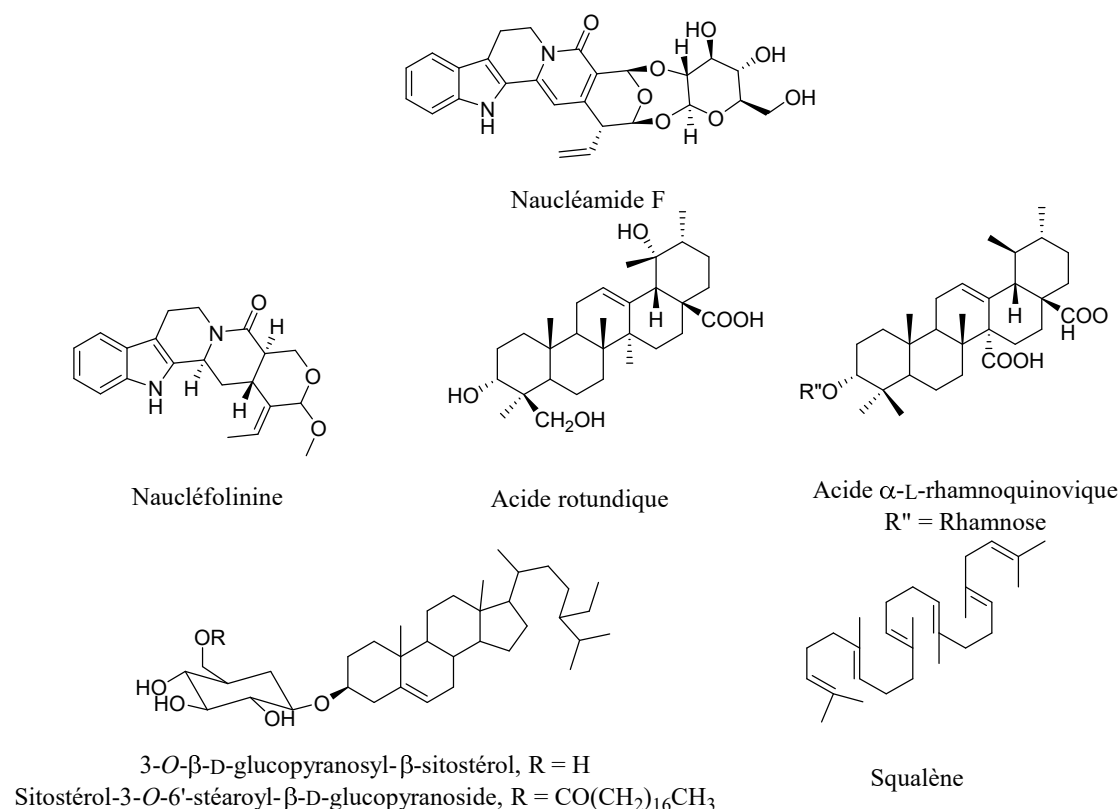


Figure 125 : Structures de la nacléamide F, de la nacléfolinine ainsi que de l'acide rotundique, de l'acide α -L-rhamnoquinovique, du 3-O- β -D-glucopyranosyl- β -sitostérol, du squalène et du sitostérol-3-O-6'-stéaroyl- β -D-glucopyranoside.

Pour finir, en 2013 sont isolés à partir des extraits méthanoliques des racines et du tronc de *Nauclea latifolia* cinq nouveaux alcaloïdes indoliques, les latifoliamides A à E avec un alcaloïde connu, l'angustoline présenté précédemment (**Figure 126**).⁴⁸²

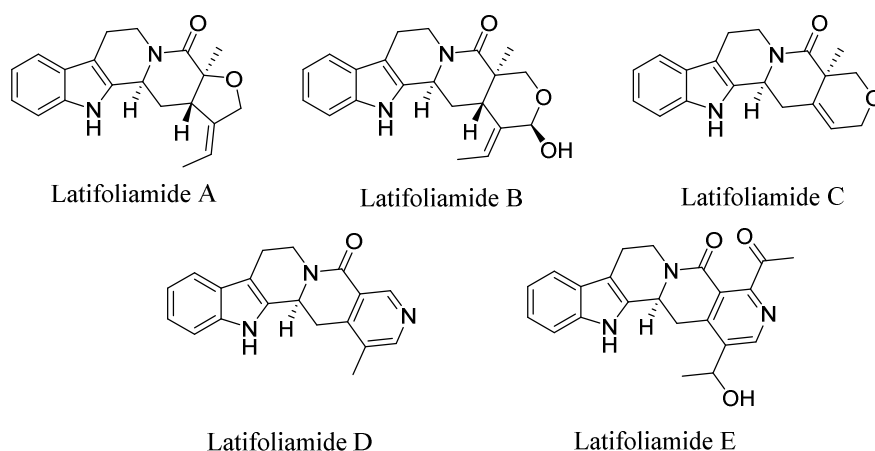


Figure 126 : Structures des latifoliamides A à E isolés à partir des extraits méthanoliques des racines et du tronc de *Nauclea latifolia*.

I.4. DÉCOUVERTE ET EXTRACTION DU TRAMADOL

Guidée par son activité antinociceptive,^{473, 475} l'extraction d'un extrait brut de l'écorce de *Nauclea latifolia* a conduit à l'isolement en 2011 au sein de notre laboratoire d'un composé alcaloïde, identifié comme étant le tramadol en version racémique.⁴⁴³ Il s'agit du troisième cas reporté de l'occurrence d'un composé médicament synthétique au sein de sources naturelles. On peut citer les benzodiazépines, isolés de plante en faibles concentrations^{483, 484} et le fluorouracile, un agent anticancéreux, obtenu à partir de l'éponge marine *Phakellia fusca*.⁴⁸⁵ Cependant, il s'agit du premier cas de découverte d'une occurrence naturelle d'un produit d'origine purement synthétique à de si fortes concentrations.

I.4.1. Isolement du tramadol au sein de l'extrait de l'écorce de *Nauclea latifolia*

Afin d'identifier ses substances actives, l'extrait méthanolique d'écorce de *Nauclea latifolia* a été soumis à un fractionnement HPLC, par l'intermédiaire d'une colonne en phase inverse.⁴⁴³ Les fractions issues de cette séparation ont été testées pour leur activité antinociceptive. Les résultats révèlent une bioactivité au sein des fractions 25 à 29, avec un maximum atteint au sein de la fraction 27. L'analyse de cette fraction par spectrométrie de masse-électrospray-temps de vol (MS-ESI-TOF) a conduit à une masse de 264.1972. A partir de ces données a été déduite la composition élémentaire de ce composé comme étant $C_{16}H_{26}NO_2$, correspondant à cinq insaturations. L'analyse RMN 1H présente quatre protons aromatiques avec un benzène cyclique 1,3-disubstitué. La présence d'un groupement méthoxylé relié au cycle benzénique est déduite par la présence d'un signal à 3,77 ppm et une intégration de trois protons. La présence d'un groupe complexe de signaux entre 1,35 et 2,65 ppm suggère la présence d'une chaîne hexyle cyclique. Les analyses RMN ^{13}C et DEPT révèlent la présence de trois carbones quaternaires. À partir des spectres RMN 1D et 2D, le carbone quaternaire de déplacement chimique 75,68 ppm est attribué à un carbone relié à un atome d'oxygène. Suite à ces déductions, la structure est assignée au composé 2-(diméthylaminométhyl)-1-(3-méthoxyphényl)cyclohexanol (**Figure 127**).⁴⁴³

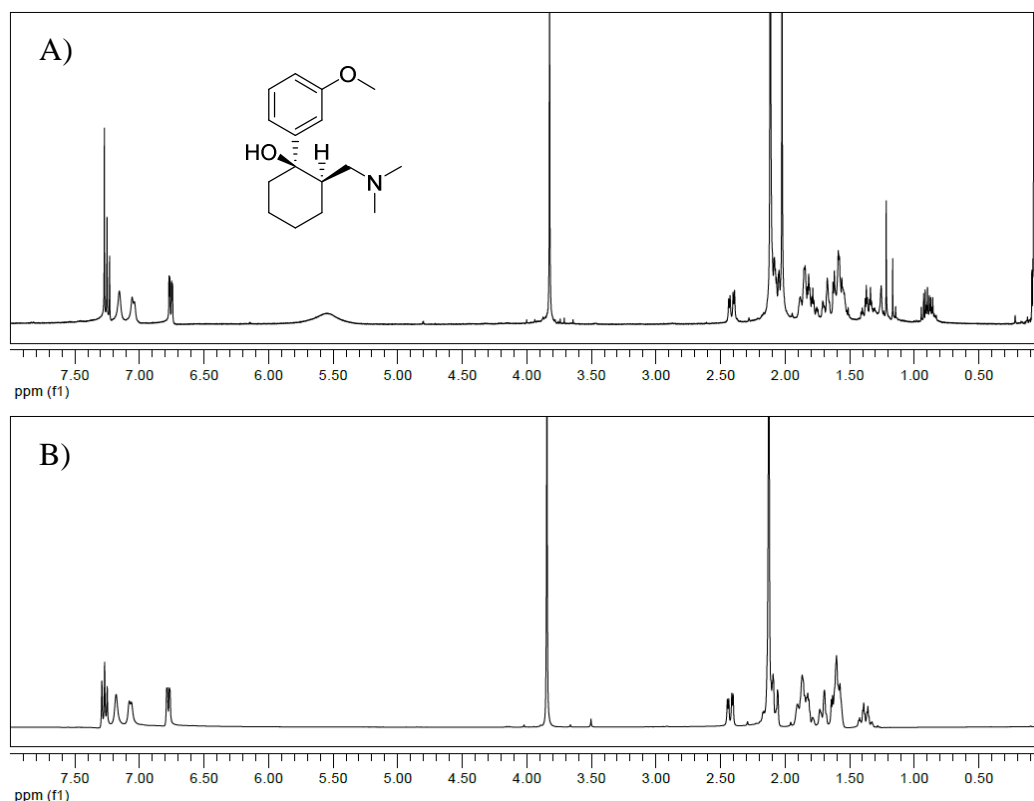


Figure 127 : Spectres RMN ^1H de l'extrait purifié provenant de l'écorce de *Nauclea latifolia* (A) et de la base libre du tramadol commercial (B).

Ce composé a été recristallisé sous sa forme chlorhydrate dans l'acétonitrile. L'analyse par diffraction des rayons X confirme la structure proposée et permet la détermination de la stéréochimie des deux centres chiraux (**Figure 128**).

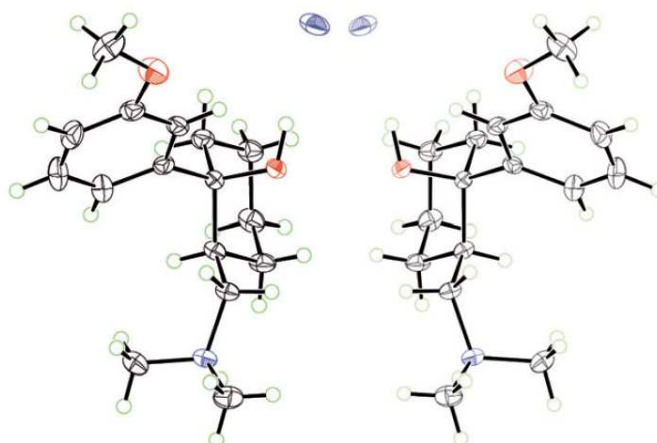


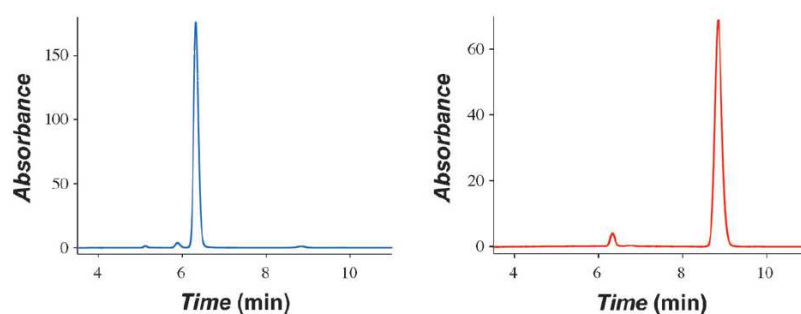
Figure 128 : Structure cristallographique obtenue par diffraction des rayons X de la forme chlorhydrate de ce composé. L'atome de chlore est en violet, l'atome d'azote en bleu et les atomes d'oxygène en rouge.

Le composé obtenu ne présente pas d'activité optique indiquant ainsi le mélange racémique du (1*R*, 2*R*)-tramadol et (1*S*, 2*S*)-tramadol.

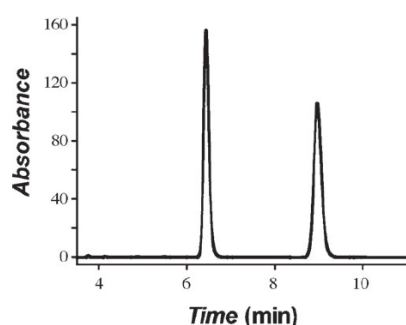
I.4.2. Confirmation de la présence du tramadol au sein de *Nauclea latifolia*

Afin de confirmer la structure du composé obtenu et la présence des deux énantiomères, une analyse HPLC sur colonne chirale a été réalisée avec pour référence chaque énantiomère du tramadol commercial, obtenu par séparation chimique à partir du racémique. Les résultats obtenus indiquent un même profil d'élution du composé isolé que celui présenté par le tramadol synthétique (**Figure 129**).

A)



B)



C)

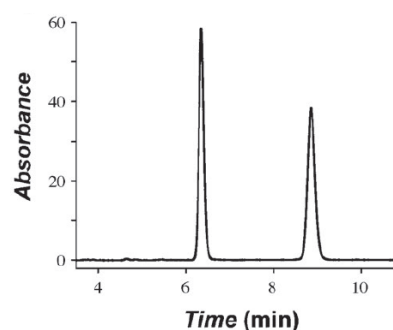


Figure 129 : A) Analyse HPLC de chaque énantiomère obtenu à partir du mélange racémique du tramadol commercial. B) Analyse HPLC du tramadol commercial. C) Analyse HPLC du composé isolé de l'extrait d'écorce de *Nauclea latifolia*.

Le caractère racémique de ce mélange est préservé indépendamment de la procédure d'extraction et du solvant utilisé et n'est pas le résultat d'un processus de racémisation ayant lieu lors de l'extraction. Cette découverte a été validée au sein de trois laboratoires différents, sur trois échantillons différents collectés en différentes périodes de l'année. Tous confirment la présence de tramadol au sein de l'écorce de *Nauclea latifolia*. Cependant, le tramadol n'a pas été détecté dans d'autres parties supérieures de la plante telles que les feuilles, le tronc ou les branches. La présence d'un azote basique au sein de la structure confère les caractéristiques alcaloïdales. En plus du tramadol, la présence d'autres alcaloïdes déjà décrit au sein de *Nauclea latifolia* ont été identifiés dans cet extrait : la déméthoxycarbonylnaocléchine, la naocléfine, la vinconsamide et la naocléamide E. Afin d'exclure le risque d'une contamination de l'écorce par du tramadol synthétique, un extrait issu de l'intérieur de l'écorce a été analysé et la présence de tramadol aux mêmes concentrations a été confirmée. Pour finir la quantité de tramadol au sein de l'extrait éthanolique d'écorce de *Nauclea latifolia* a été déterminée par RMN et évalué à 3,9% en masse soit une concentration de 0,4% en masse au sein de l'écorce séchée.⁴⁴³

Suite à cette découverte, nous avons entrepris de comprendre l'origine du tramadol au sein de *Nauclea latifolia*. En particulier, nous avons émis l'hypothèse que le tramadol serait produit par la plante elle-même. Nous avons ainsi entrepris dans ce projet la synthèse biomimétique du tramadol. Cette étude fut débutée par le Dr. Romain Haudecoeur lors de sa thèse au sein du Département de Pharmacochimie Moléculaire de Grenoble et poursuivit lors des travaux présentés dans cette thèse.

II. Travaux personnels : synthèse biomimétique du tramadol

II.1. OBJECTIFS DES TRAVAUX PERSONNELS

Afin d'étudier l'origine du tramadol au sein de la plante *Nauclea latifolia*, nous avons émis dans un premier temps l'hypothèse d'une voie de biosynthèse du tramadol sur la base de données issue de la littérature. Puis, dans un second temps, nous avons validé certaines étapes clés critiques de cette biosynthèse par le biais de synthèses biomimétiques réalisées au laboratoire, afin de vérifier si ces étapes pouvaient être réalisées sans catalyse enzymatique.

II.2. VOIE BIOSYNTHETIQUE PROPOSÉE

Certaines parties de la structure du tramadol ont déjà été caractérisées au sein de différents produits naturels. Par exemple, le groupement *N*, *N*-diméthyle apparaît au sein de nombreux alcaloïdes et des structures possédant un groupement *N*, *N*-diméthyl-2-aminométhyl-cyclohexane sont connues.⁴⁸⁶ De nombreux produits naturels phénoliques contiennent également un groupement *mé*ta-méthoxy, tels que l'acide férulique, la vanilline, les stilbènes et les aurones.⁴⁸⁷

Nous proposons ainsi la biosynthèse du tramadol comme étant constituée de deux étapes clés. La première étape est la condensation de la fonction émol de la 3-méthoxyacétophénone **59** sur l'aldéhyde du 5-diméthylaminopentanal **60**. La seconde étape clé est la réaction de cyclisation finale s'effectuant par une réaction d'aldolisation entre une énamine issue de l'iminium **64** formé avec le carbone α du groupement phényle permettant ainsi d'obtenir le tramadol, étape au cours de laquelle la racémisation a lieu (**Schéma réactionnel 31**).⁴⁸⁸

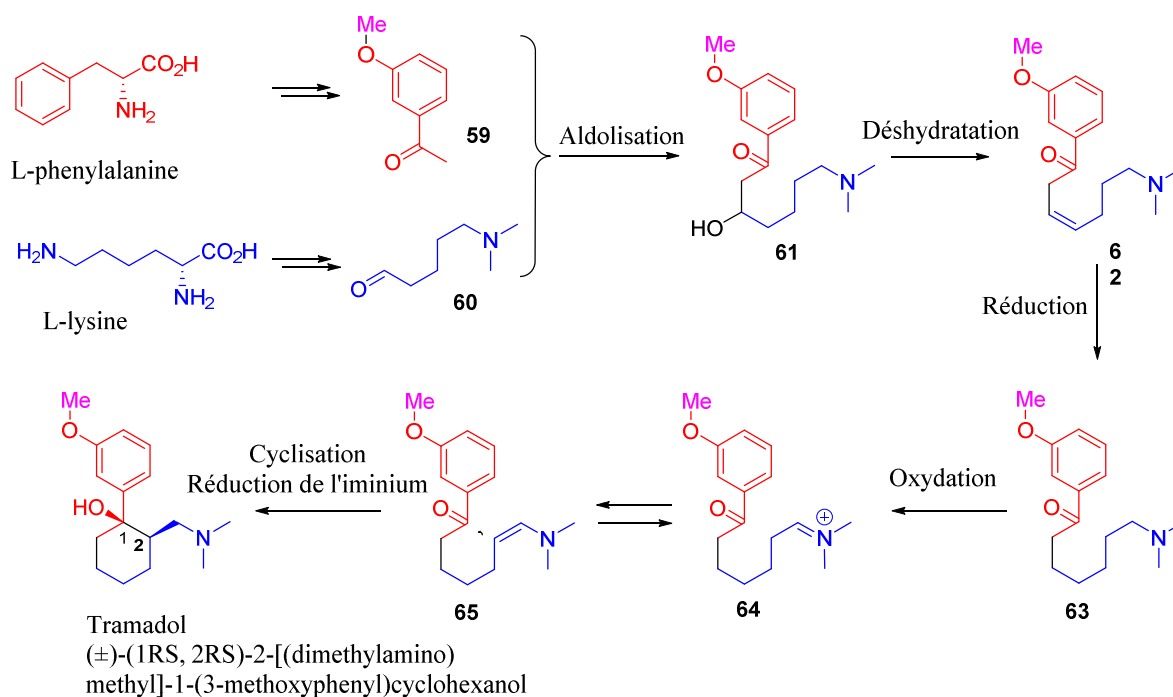


Schéma réactionnel 31: Biosynthèse proposée du tramadol.

Une étude bibliographique approfondie a permis l'hypothèse de cette voie biosynthétique du tramadol à partir des intermédiaires **59** et **60**.

II.2.1. Voie de biosynthèse de l'intermédiaire 59

Les acétophénones, telles que l'intermédiaire **59** et son précurseur la 3-hydroxyacétophénone sont fréquemment rencontrées chez les bactéries et les plantes tels que les racines de *Urtica dioica*⁴⁸⁹ ou les huiles essentielles de *Sideritis italica* (Miller) Greuter et Burdet⁴⁹⁰ ou biosynthétisées par certaines plantes afin de se protéger de certains champignons.⁴⁹¹ De plus, un alcaloïde possédant un groupement 3-méthoxyphényle, dérivant probablement de la 3-méthoxyacétophénone, a été identifié au sein de *Lobelia siphilitica*.⁴⁹²

Deux voies biosynthétiques peuvent être à l'origine du squelette de l'acétophénone. D'une part, les acétophénones peuvent provenir du métabolisme de la L-phénylalanine, acide aminé dérivant de l'acide shikimique. Grâce à la phénylalanine ammonia lyase (PAL), l'acide cinnamique est formé puis une succession de β -oxydations conduit au motif acétophénone (**Figure 130**). Ceci est décrit chez le champignon *Bjerkandera adusta*⁴⁹³ et chez la plante *Camellia sinensis*.⁴⁹⁴

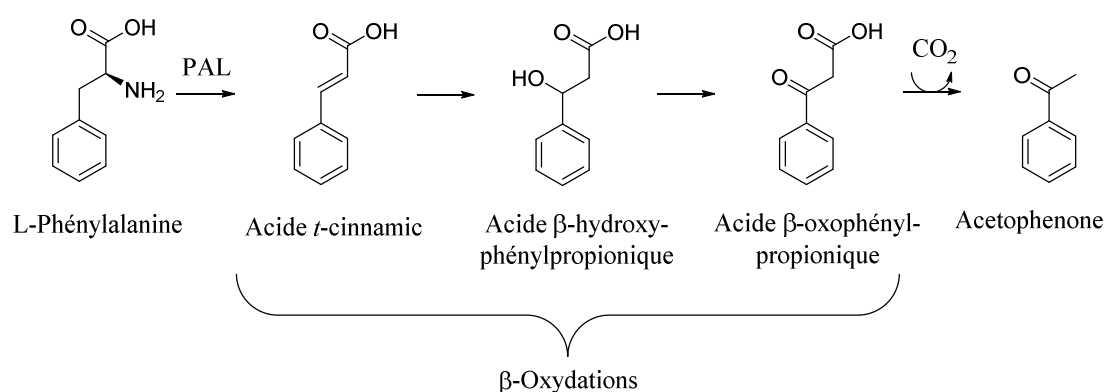


Figure 130 : Hypothèse de biosynthèse d'acétophénone à partir de la L-phénylalanine dans le champignon *Bjerkandera adusta*⁴⁹³ (PAL = Phénylalanine ammonia lyase).

Les acétophénonnes peuvent également dériver du feryloyl-CoA *via* des enzymes végétales⁴⁹⁵ et la production de la L-3-hydroxyphénylalanine décrit dans *Festuca rubra*⁴⁹⁶ implique le rôle de l'enzyme phénylalanine 3-hydroxylase. Pour finir, à partir de l'oxydation en 3, une méthylation par le biais de l'enzyme S-adénosylméthionine (SAM) méthyl transférase comme donneur de groupement méthyle permet d'introduire un groupement 3-méthoxy puis une β -oxydation⁴⁹³ conduit à la formation de l'intermédiaire **59** (**Figure 131**).

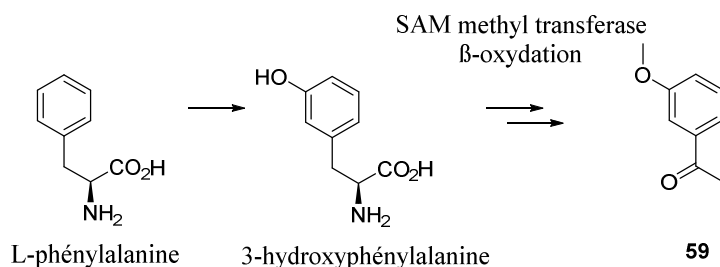


Figure 131 : Hypothèse de biosynthèse de l'intermédiaire **59**.

Une route biosynthétique alternative peut être également envisagée à partir d'acétyl-CoA, comme il l'a été démontré dans *Knipholia pumila*.⁴⁹⁷ Cependant, pour cette dernière hypothèse, uniquement les motifs 2-hydroxyacétophénone et/ou 4-hydroxyacétophénone peuvent être obtenus. Ceci est ainsi incompatible avec la présence d'un groupement méthoxy en position 3, tel que le présente le tramadol. De plus, des données supplémentaires, se basant sur la répartition non statistique des isotopes lourds au cours de la biosynthèse de produits naturels tendent à confirmer l'improbabilité de l'origine de l'acétophénone *via* l'acétyl-CoA.⁴⁹⁸

II.2.2. Voie de biosynthèse de l'intermédiaire 60

Contenant une amine basique, le tramadol peut être classé dans la famille des alcaloïdes, pour lesquels la biosynthèse implique régulièrement un ou plusieurs précurseurs acides aminés, tels que la L-lysine, la L-arginine, la L-tyrosine, la L-phénylalanine ou le L-tryptophane.

L'intermédiaire **60** semble ainsi dériver de la L-lysine, classiquement décarboxylée en cadavérine (1,5-diaminopentane) par la lysine décarboxylase dans une première étape. Puis une seconde étape de désamination oxydante par l'amine oxydase à cuivre conduit à la formation du motif 5-aminopentanal (**Figure 132**). Ces deux étapes sont communes à la biosynthèse de plusieurs classes d'alcaloïdes.⁴⁹⁹

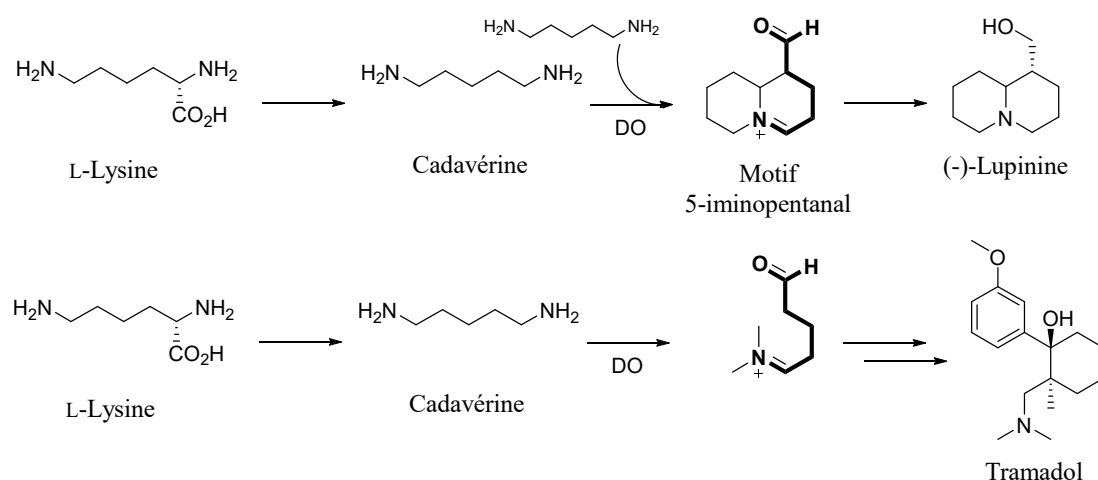


Figure 132 : Voie de biosynthèse de la (-)-lupinine, un alcaloïde quinolizidinique connu et voie de biosynthèse proposé pour l'intermédiaire **60**.

Pour finir, le 5-aminopentanal subit une *N, N*-diméthylation catalysée par des SAM méthyles transférases⁵⁰⁰ suivie d'une désamination oxydante catalysée par une diamine oxydase afin de former le *N, N*-diméthyliminopentanal **60**. Des analogues de structures semblables à **60** ont été largement étudiés et proposés comme intermédiaires clés de la biosynthèse d'alcaloïdes tels que la (-)-lupinine.⁵⁰¹

Ayant établi une première proposition plausible de voie de biosynthèse pour le tramadol, un second objectif a été de vérifier si cette cascade biosynthétique pouvait être réalisée sans catalyse enzymatique au laboratoire. Nous nous sommes particulièrement intéressés à la synthèse du composé **65**, possible via la synthèse d'un intermédiaire clé, le 7-(1-

méthoxyphényl)-7-oxoheptanal (composé **69**). Puis nous avons réalisé la dernière étape de cyclisation de **65** en tramadol afin de conforter notre hypothèse de biosynthèse et de comprendre les mécanismes mis en jeu.

II.2.3. Synthèse de l'intermédiaire clé, le 7-(1-méthoxyphényl)-7-oxoheptanal **69**

Un travail réalisé antérieurement par le Dr. Haudecoeur au laboratoire a permis la synthèse, avec de hauts rendements, du 7-(1-méthoxyphényl)-7-oxoheptanal **69** (Schéma réactionnel 32).

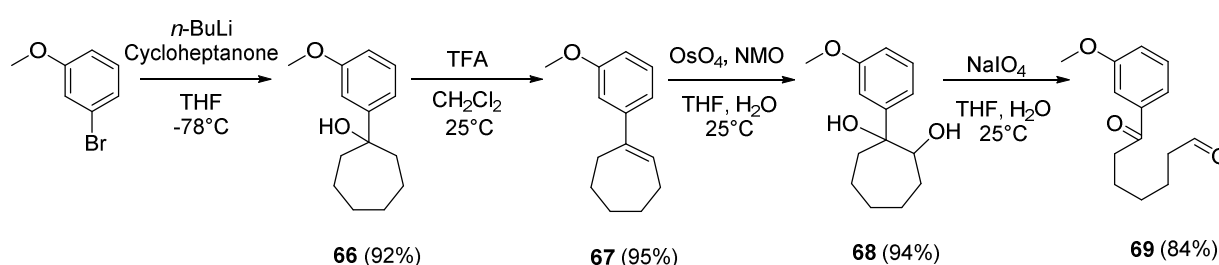


Schéma réactionnel 32 : Préparation de l'intermédiaire clé **69**.

Une première étape consiste en la lithiation du 3-méthoxybromobenzène avec du *n*-butyllithium dans le THF à -78°C. Le lithien formé *in situ* est alors mis en réaction avec la cycloheptanone à -78°C afin de former l'alcool tertiaire désiré **66**. Cet alcool est ensuite engagé dans une étape de déshydratation par action de l'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane afin de former l'alcène **67**. L'oxydation de **67** est réalisée à l'aide d'une quantité catalytique de tétraoxyde d'osmium et d'un excès d'oxyde de *N*-méthylmorpholine (NMO) afin d'obtenir le diol **68** avec un rendement de 94%. La dernière étape consiste en une coupure oxydante du diol **68** par le périodate de sodium afin d'obtenir l'intermédiaire clé **69** avec un rendement de 84%.

II.2.4. Cyclisation de l'intermédiaire **69** et obtention du tramadol

Il est nécessaire ensuite de convertir l'intermédiaire **69** en iminium **64** par un traitement avec la diméthylamine. Cet intermédiaire **64** a été isolé et caractérisé mais sa conversion en tramadol a conduit à un mélange complexe de composés non identifiés. En parallèle, nous avons tenté de convertir directement **69** en tramadol sans isoler l'iminium **64** et son isomère

énamine **65** par traitement de **69** avec la base libre de la diméthylamine suivie d'une réduction *in situ* avec du cyanoborohydrure de sodium (**Schéma réactionnel 33**).

Remarque : le borohydrure de sodium a également été utilisé comme agent réducteur à la place du cyanoborohydrure de sodium. Les deux composés conduisent à des résultats identiques.

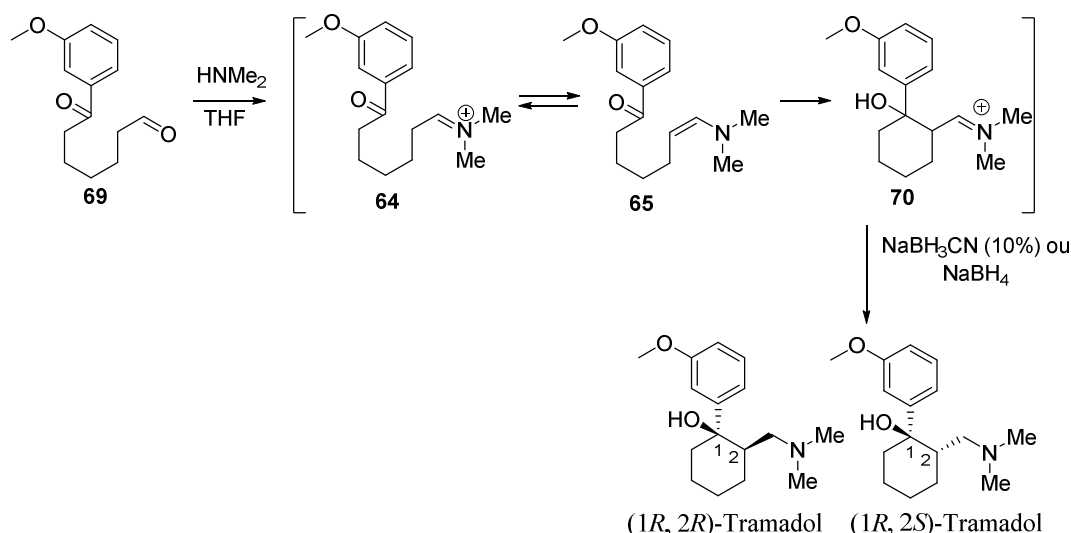


Schéma réactionnel 33 : Étapes de conversion de **69** en tramadol.

La formation de tramadol résulte ainsi de l'énamine **65**, issue de l'isomérisation de l'iminium **64**, subissant une addition intramoléculaire sur le carbonyle afin de former l'iminium **70**, qui à la suite de la réduction, conduit au tramadol. Ce mécanisme s'inspire de la réaction de Hajos-Parrish-Eder-Sauer-Wiechert (6-enolexo), réaction d'aldolisation catalysée par la L-proline.⁵⁰² En effet, sur des dérivés dicarbonylés, la proline conduit à la formation sélective d'une énamine sur l'un des carbonyles. Il s'ensuit une attaque nucléophile intramoléculaire sur le second groupement carbonyle puis l'élimination de l'organocatalyseur par hydrolyse afin de conduire à l'aldol ou au cétole correspondant. Dans le cas du tramadol, la diméthylamine joue le rôle d'organocatalyseur, mais en quantité stœchiométrique afin de pouvoir réduire l'iminium formé *in situ* par des conditions classiques. L'aldolisation organocatalysée et l'amination réductrice de l'aldéhyde peuvent se faire ainsi en même temps. Des réactions analogues décrivant la réalisation d'une aldolisation à partir d'une énamine générée *in situ*, directement suivie d'une réduction de l'iminium formé en présence de trichlorosilane et d'une base de Lewis ont été récemment décrites.⁵⁰³

Des analyses préliminaires par HPLC nous ont permis de confirmer la formation du (1*R*, 2*R*)-tramadol et de son diastéréoisomère, le (1*R*, 2*S*)-tramadol au sein de nos bruts réactionnels. Puis une purification par UHPLC-TOF-MS et des analyses RMN nous ont permis d'isoler le tramadol et de caractériser les isomères ainsi que les composés secondaires formés.

II.3. CARACTÉRISATION DU TRAMADOL AU SEIN DU BRUT RÉACTIONNEL ET ANALOGUES FORMÉS

Dans un premier temps, les bruts réactionnels de synthèse ont été soumis aux analyses HPLC et RMN afin de détecter la présence ou non du tramadol, puis une fois la présence de tramadol confirmée, une purification par HPLC préparative nous a permis d'isoler le tramadol et de déterminer les isomères formés.

Les analyses par HPLC ont été réalisées au sein de l'équipe du Dr. Thierry Lomberget de l'Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de l'Université de Lyon 1 tandis que les analyses RMN ont été effectuées par l'équipe du Dr. Emerson Ferreira Queiroz de la Section des Sciences Pharmaceutiques de l'Université de Genève.

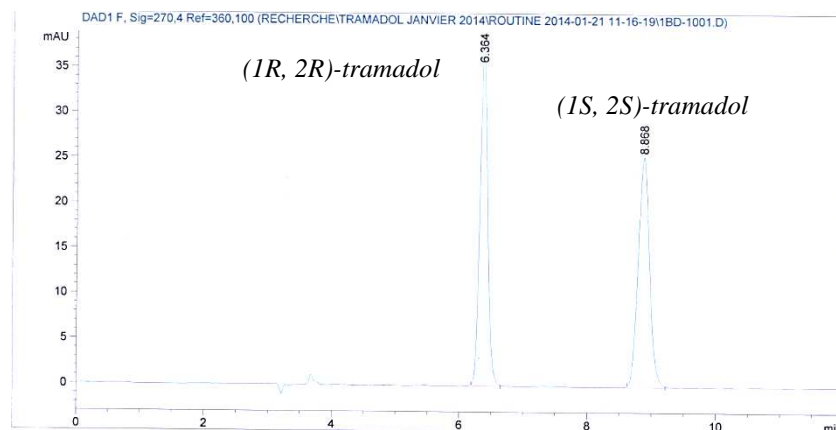
II.3.1. Détection du tramadol au sein des bruts réactionnels

Les analyses LCMS préliminaires (0,5 mg/mL dans un mélange eau/acétonitrile 1/1) ont dans un premier temps démontré la présence de deux composés majoritaires, le produit de départ (262,2 [M+H]⁺) et le tramadol (264,2 [M+H]⁺).

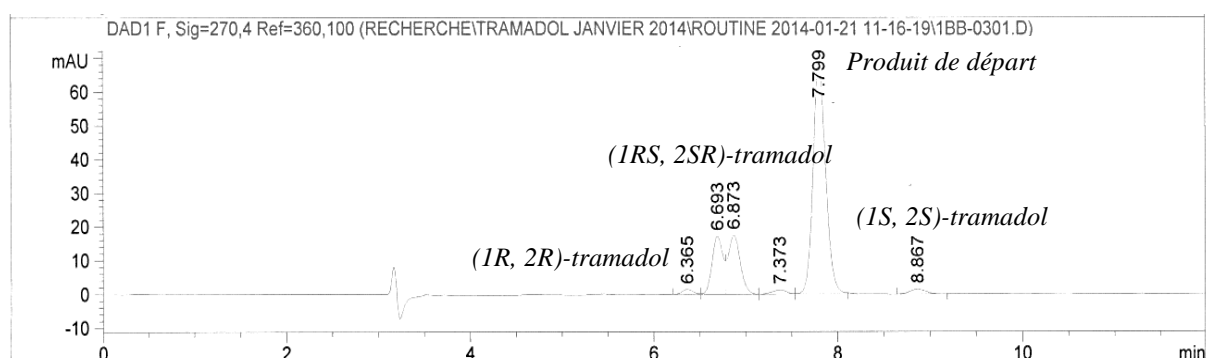
Puis, deux échantillons, A et B, issus de différents bruts réactionnels ont été analysés par HPLC sur phase chirale AD-H au sein d'un mélange isopropanol/heptane.

Le profil HPLC de l'échantillon A présente deux pics de faible intensité à 6,365 et 8,867 minutes pouvant correspondre au (1*RS*, 2*RS*)-tramadol sous forme racémique. Ceci fut confirmé par comparaison avec l'analyse HPLC de la base libre du mélange racémique du (1*RS*, 2*RS*)-tramadol. Ce profil présente également deux pics de plus forte intensité à 6,693 et 6,873 minutes pouvant correspondre au mélange racémique du (1*RS*, 2*SR*)-tramadol. Le profil de l'échantillon B ne présente quant à lui que deux pics à 6,695 et 6,874 minutes, pouvant correspondre ainsi au mélange racémique du (1*RS*, 2*SR*)-tramadol. Le pic restant à 7,80 minutes semble vraisemblablement correspondre au produit de départ avant cyclisation (**Figure 133**).

A)



B)



C)

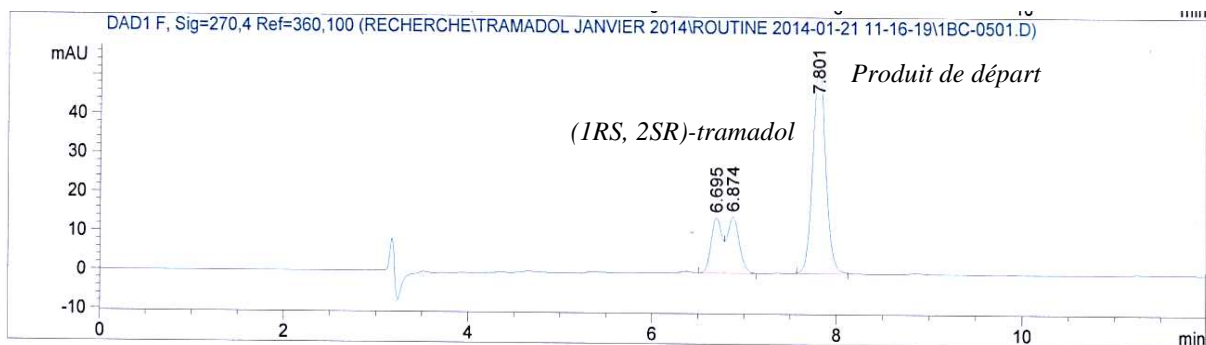


Figure 133 : Profils HPLC des échantillons A et B, bruts issus de la réaction entre le composé **69** et la diméthylamine suivie de la réduction par le cyanoborohydrure de sodium ou le borohydrure de sodium dans le méthanol. A) Profil HPLC de la base libre du mélange commercial du (1R, 2R)-tramadol racémique. B) Profil HPLC de l'échantillon A. C) Profil HPLC de l'échantillon B.

De plus, l'analyse des bruts réactionnels par RMN a révélé la présence, en plus du tramadol, de sa forme ouverte **71** ainsi que de deux nouveaux composés, mis en évidence par UPHPLC-TOF-MS et RMN ^1H . Ces deux composés sont la cétone α,β -insaturée **72** et l'aminocétone **73** (Figure 134).

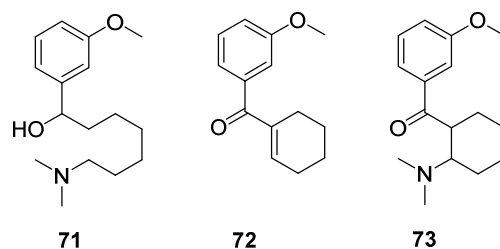


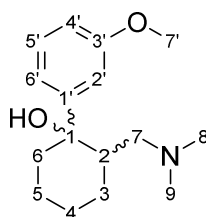
Figure 134 : Produits secondaires isolés du brut réactionnel lors de la formation du tramadol.

L'amino-alcool **71** est probablement formé par double réduction du composé **65**. La cétone α,β -insaturée **72** peut être formée par aldolisation intramoléculaire du composé **69** en présence de diméthylamine basique. L'aminocétone **73** se forme via une réaction de Mannich intramoléculaire impliquant l'énolisation de la fonction cétone de l'intermédiaire **64**. Les analyses des composés **72** et **73** se trouvent en annexe VI.

II.3.2. Purification et caractérisation du tramadol formé

À l'issue d'une purification par HPLC semi-préparative⁵⁰⁴ des bruts réactionnels issus de la cyclisation de **69** en présence de diméthylamine puis de la réaction avec le cyanoborohydrure de sodium ou du borohydrure de sodium, 13 fractions ont été isolées et analysées par RMN ¹H. Les résultats obtenus démontrent que ces fractions contiennent du tramadol (**Figure 135**).

A)



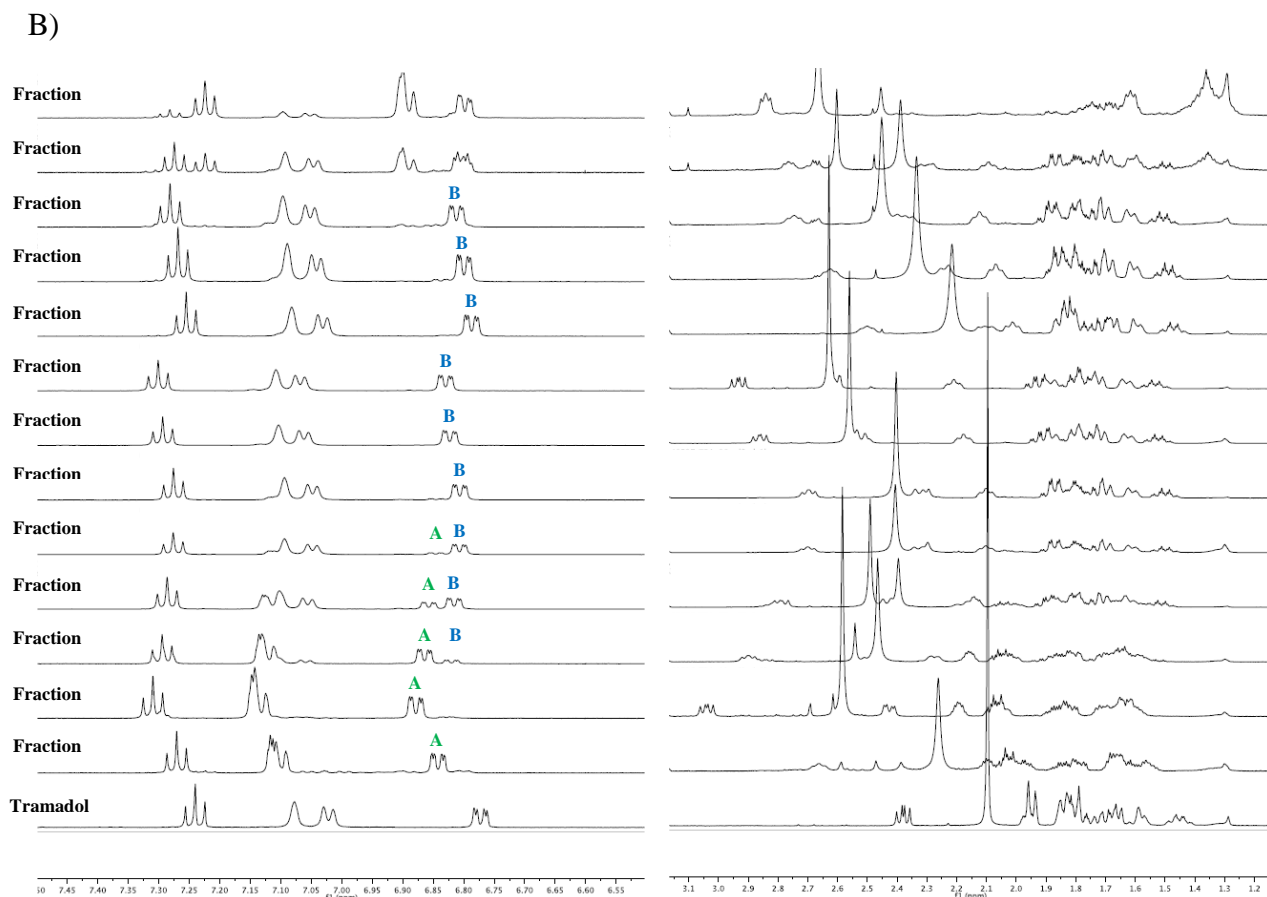
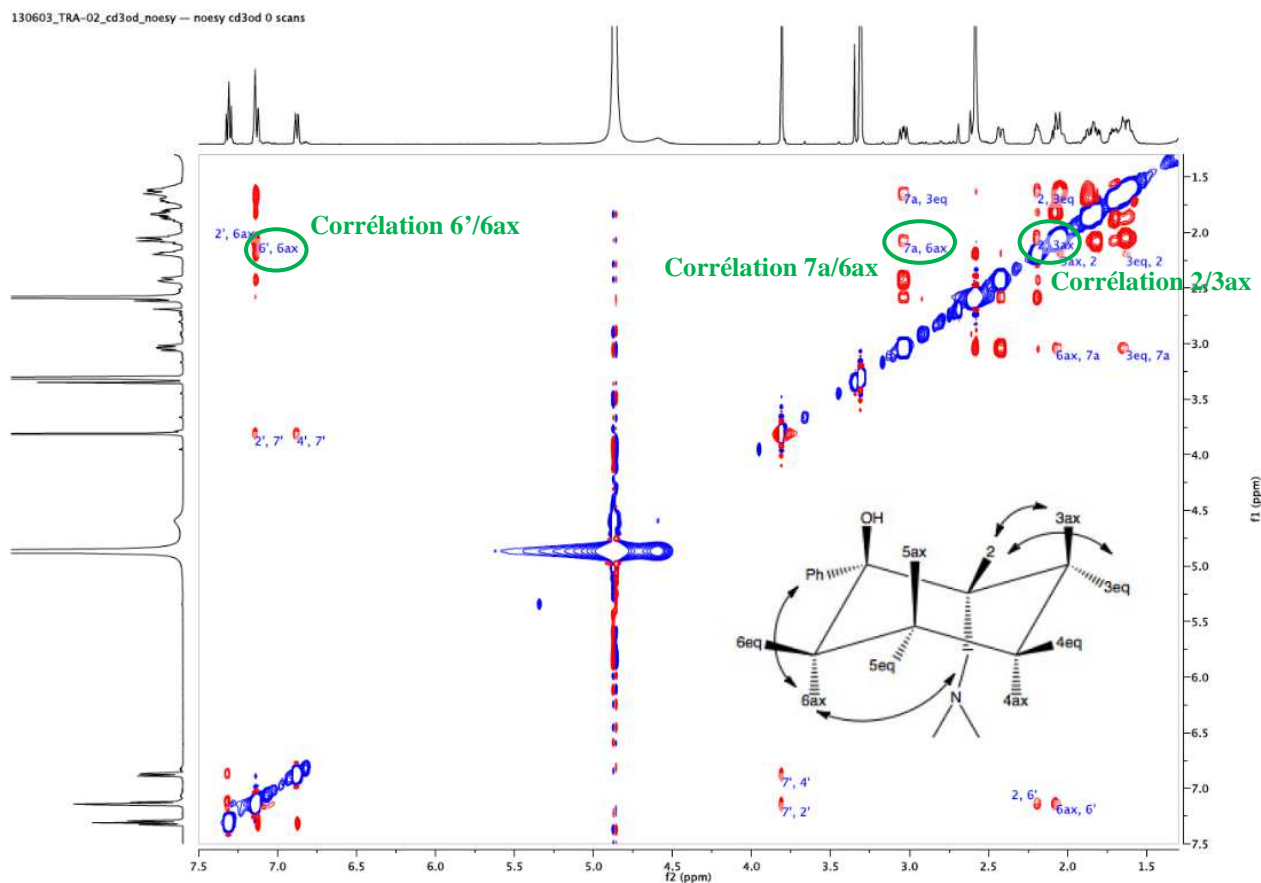
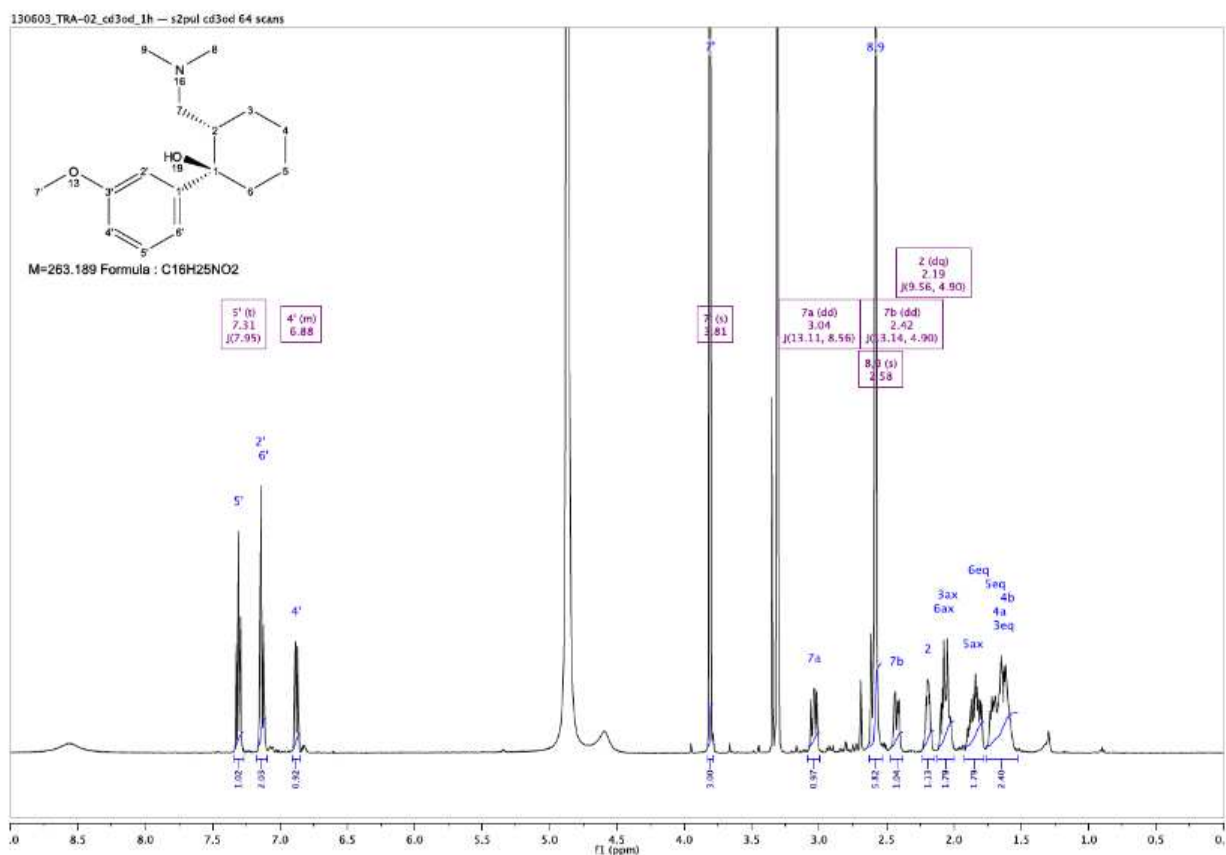


Figure 135 : A) Structure annotée du tramadol. B) Analyses RMN ^1H obtenues dans le méthanol deutéré pour les 13 fractions isolées par HPLC préparative issues d'un brut réactionnel. La lettre A verte correspond au signal du composé A et la lettre B bleue correspond au signal du composé B.

Dans un premier temps, en observant les signaux présents entre 6,7 et 6,9 ppm au sein des fractions 3, 4 et 5, nous pouvons remarquer la présence de deux composés différents, nommés par défaut A et B. Ainsi, les fractions 1 et 2 semblent contenir uniquement le composé A, les fractions 3 à 5 le mélange des composés A et B et pour finir les fractions 6 à 11 le composé B (**Figure 135**). Ce signal correspondant au proton 4' chez le tramadol commercial, nous avons supposé que les composés A et B pouvaient correspondre aux deux diastéréoisomères du tramadol. Afin de vérifier cette hypothèse, les spectres RMN COSY, HSQC et HMBC ont été réalisés sur les fractions 2 et 6 propres contenant respectivement les composés A et B. L'ensemble de ces analyses, dont les spectres se trouvent en annexe VII, confirment en effet que les composés A et B sont des isomères du tramadol. Les analyses RMN NOESY, permettant de déterminer certaines interactions dues à une proximité spatiale, ont permis de les identifier (**Figure 136**).

CHAPITRE 4. SYNTHÈSE BIOMIMÉTIQUE DU TRAMADOL

A)



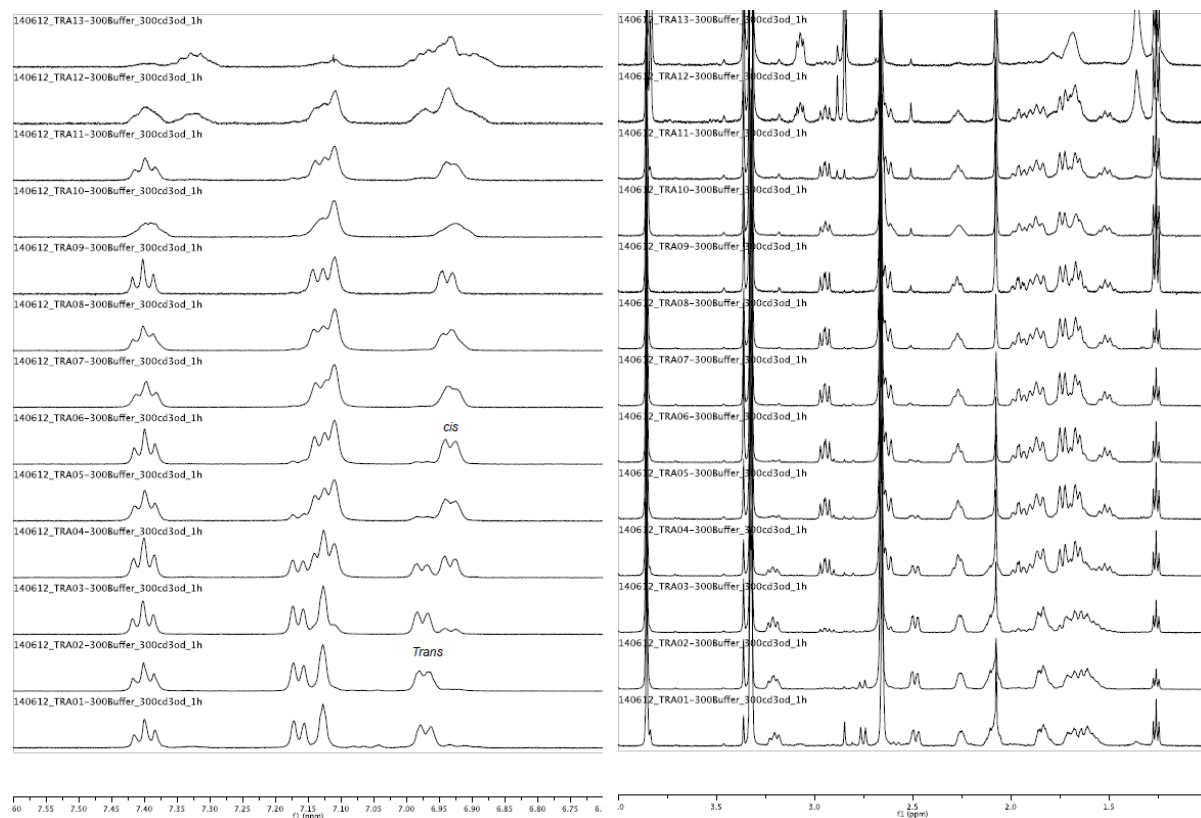
Les différences spatiales existantes entre les deux isomères sont les positions axiales ou équatoriales du groupement *N*, *N*-diméthylaminométhyle et du proton 2 portés par le cyclohexane. Sur le spectre NOESY de la fraction 2 (**Figure 136A**), on peut observer un signal de corrélation entre le proton 2 et le proton 3 axial ainsi qu'un signal de corrélation entre le proton 7a et le proton 6 axial indiquant ainsi que le groupement *N*, *N*-diméthylaminométhyle se trouve en position axiale. De plus, le proton 6 axial corrèle avec le proton 6' du cycle aromatique induisant ainsi une position équatoriale pour le cycle 3-méthoxyphényle. De ces données, nous pouvons ainsi conclure que l'isomère présent dans la fraction 2 est l'isomère (1*R*, 2*S*)-tramadol.

Concernant la fraction 6, nous pouvons observer sur le spectre NOESY (**Figure 136B**) une corrélation entre le proton 7a et le proton 3 axial, ainsi que des corrélations entre le proton 2 et les protons 4 axial et 6 axial. Ces données indiquent que le groupement *N*, *N*-diméthylaminométhyle se trouve en position équatoriale. Pour finir, une corrélation identique à la fraction 2 entre le proton 6 axial et le proton 6' du cycle aromatique indique que le cycle 3-méthoxyphényle se situe toujours en position équatoriale. Nous pouvons ainsi conclure que l'isomère présent dans la fraction 6 est l'isomère (1*R*, 2*R*)-tramadol.

Le tramadol formé s'est donc révélé être un mélange de 70% de l'isomère (1*R*, 2*R*)-tramadol et 30% de l'isomère (1*R*, 2*S*)-tramadol. Le composé **70** a été converti en tramadol avec un rendement de 10%.

Bien que l'ensemble des spectres RMN ¹H des fractions 1 à 13 (**Figure 135**) pris individuellement tendent vers l'hypothèse que ces fractions contiennent du tramadol, nous observons un décalage au niveau des déplacements chimiques. En effet ces spectres ne sont pas superposables. Cette différence peut s'expliquer par une variation du pH. En effet, lorsque les analyses RMN ¹H des 13 fractions précédentes ont été réalisées dans une solution tampon phosphate à un pH connu, le décalage des déplacements chimiques disparaît et les spectres deviennent superposables (**Figure 137**)

A)



B)

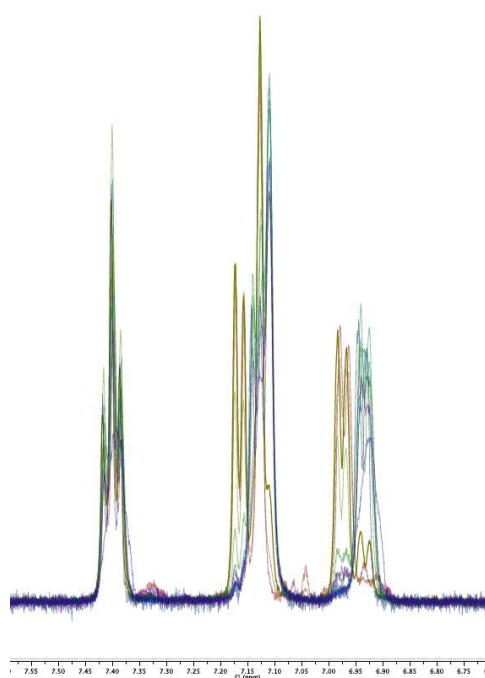


Figure 137 : A) Analyses RMN ^1H obtenues dans le méthanol deutéré pour les 13 fractions dans un tampon phosphate. B) Superposition des pics aromatique (entre 6,80 et 7,50 ppm) des 13 fractions.

III. Conclusion du chapitre 4

À partir d'une large recherche bibliographique et guidés par la répartition non statistique des atomes lourds tels que ^{13}C ou ^{18}O (travaux publiés par nos collaborateurs au sein du journal *PNAS*),⁴⁹⁸ nous sommes parvenus à proposer une synthèse biomimétique du tramadol. Bien que le rendement de conversion de **70** en tramadol soit faible (10%), nous avons pu démontrer qu'un intermédiaire clé de la synthèse hypothétique du tramadol pouvait être obtenu et converti par le biais de transformations en cascade en tramadol, et ceci sans processus enzymatiques généralement utilisés par les plantes. En effet, l'étape clé de cyclisation de cet intermédiaire en tramadol a été optimisée et le tramadol a pu être identifié, isolé et caractérisé par HPLC et RMN. La formation du cycle de manière non enzymatique permet d'expliquer l'occurrence du racémique naturel, résultat de l'attaque sur les deux faces *re*- et *si*- de l'électron sur le carbone C₁. La formation minoritaire du (1*R*, 2*S*)-tramadol ainsi que le fait que ce composé ne soit pas synthétisé au sein de *Nauclea Latifolia* apporte un argument supplémentaire à l'origine naturelle du tramadol. L'ensemble de ces travaux a été publié dans le journal *Chemical Communications*.⁵⁰⁵

Malgré ces résultats, l'équipe du Dr. Spiteller de l'Institut de la Recherche Environnementale de Dortmund associée à des équipes camerounaises remettent en question l'origine naturelle du tramadol et soutiennent l'hypothèse selon laquelle le tramadol dans *Nauclea latifolia* aurait pour origine une contamination anthropogénique des sols par les excréments des fermiers et de leur bétail.⁵⁰⁶ En effet, d'après leurs études, d'autres extraits de la plante issus du nord du Cameroun contiennent dix milles fois moins de tramadol que nos extraits et des extraits provenant du sud de Cameroun n'en contiennent aucune trace détectable. D'après une étude locale, le tramadol serait facilement accessible aux fermiers sur de nombreux marchés locaux et serait ainsi fourni au bétail afin de leur permettre de travailler de longues journées sous la chaleur. De plus, différentes analyses des extraits du sol et des eaux proches des arbres confirment la présence de métabolites mammifères du tramadol indiquant ainsi une

contamination externe du *Nauclea latifolia* par le tramadol. Malgré ces résultats, différentes zones d'ombre subsistent tels que les faibles connaissances quant au métabolisme du tramadol au sein du bétail. De plus, les extraits utilisés pour notre étude proviennent d'un parc national où tout élevage de bétail est interdit. Ainsi, des études complémentaires seront nécessaires afin de préciser et de confirmer l'origine du tramadol au sein de *Nauclea latifolia*. Des études de nutrition de la plante à l'aide de composés radiomarqués ou marqués par un isotope sont prévues et permettront ainsi de lever le voile sur ce mystère.

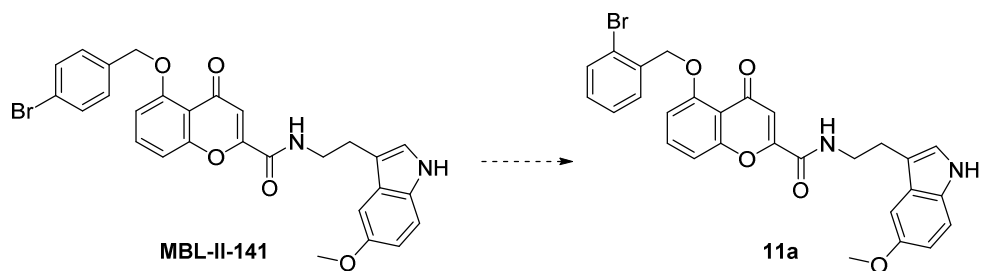
CONCLUSION GÉNÉRALE

CONCLUSION GÉNÉRALE

Les protéines membranaires ABCG2 et MRP1, appartenant à la famille des transporteurs ABC, sont impliquées dans le phénotype de résistance à de multiples drogues anticancéreuses (MDR). Ces protéines sont capables de transporter hors de la cellule un large panel de substrats endogènes et exogènes grâce à l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP. Cette caractéristique leur confère un grand nombre de rôles physiologiques. Cependant cette activité de transport est mise à profit par les cellules cancéreuses, capables de surexprimer ces protéines afin d'effluer hors des cellules les agents anticancéreux et ainsi se protéger de leurs effets. Afin de palier à ce phénomène de chimiorésistance, deux stratégies ont été envisagées pour chacune des protéines :

- l'inhibition de l'activité de transport de la protéine ABCG2 afin de stopper l'efflux massif de l'agent anticancéreux et ainsi potentialiser son effet ;
- la mise au point d'inducteurs sélectifs d'apoptose, capables de cibler sélectivement les cellules chimiorésistantes surexprimant MRP1.

La première partie de ce travail de thèse a consisté en la conception, la synthèse et l'évaluation biologique de nouveaux inhibiteurs actifs, sélectifs et non toxiques de la protéine ABCG2. Nous avons choisi le composé **MBL-II-141**, inhibiteur de référence d'ABCG2, comme composé chef de file à partir duquel différentes pharmacomodulations ont été effectuées. Plusieurs parties de la molécule ont ainsi été modulées et 38 composés ont été synthétisés et testés pour leur activité d'inhibition du transport de la mitoxantrone *via* ABCG2, leur sélectivité vis-à-vis de la P-gp et de MRP1, leur cytotoxicité et leurs activités ATPasiques basale et couplée. À l'issue de ces tests biologiques, les composés synthétisés se sont révélés être des inhibiteurs plus ou moins efficaces. Cependant, aucun n'est parvenu à atteindre les résultats obtenus pour le **MBL-II-141** à l'exception du composé **11a**, dont l'atome de brome a été déplacé en *ortho* du groupement benzyloxy porté par la chromone.



CONCLUSION GÉNÉRALE

Cependant, malgré un grand nombre de pharmacomodulations réalisées, il devient difficile d'obtenir des composés plus efficaces en termes d'inhibition de l'activité de transport que le **MBL-II-141**. Notre attention se portera ainsi sur la synthèse de nouvelles structures plus complexes, jouant sur la polyspécificité de la protéine ABCG2 et pouvant atteindre simultanément plusieurs sites d'interaction. Les études *in vitro* et *in vivo* du **MBL-II-141** seront également poursuivies.

L'ensemble de ce travail a fait l'objet d'une revue dans le journal *Future Medicinal Chemistry*²⁶⁹ et d'un article paru dans le *Journal of Medicinal Chemistry*.²⁵⁴ Les tests *in vivo* du **MBL-II-141**, réalisés par nos collaborateurs biologistes ont également été publiés dans le journal *Oncotarget*²⁴⁰. Les derniers résultats de pharmacomodulations du **MBL-II-141** sont en cours de rédaction en vue d'une publication dans un journal de chimie médicinale.

Après la mise en évidence de l'existence d'au moins deux sites d'interaction de nos inhibiteurs avec ABCG2, l'un conduisant à une stimulation de l'activité ATPasique basale, l'autre à une inhibition de cette même activité, nous avons tenté de déterminer les différences structurales et la nature des interactions caractérisant chacun de ces deux sites. Nous avons ainsi entrepris la construction, grâce au logiciel de modélisation moléculaire FLAP, de deux pharmacophores pour chacun des deux sites d'interaction. Ces deux modèles ont ensuite été utilisés afin de mener un criblage virtuel d'une chimiothèque de composés disponibles commercialement. Les études biologiques de quelques composés issus de ce criblage virtuel sont actuellement en cours et nous permettront de valider ou non la structure de nos pharmacophores. Selon les résultats biologiques obtenus, cette approche jamais décrite pourra faire l'objet d'une publication de haut niveau.

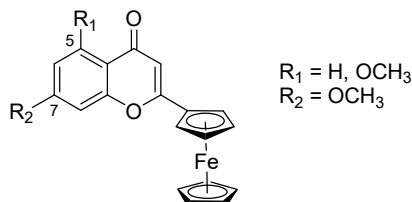
Une seconde partie de ce travail a consisté en la mise au point de nouveaux modulateurs de MRP1, capables d'induire la mort par apoptose sélectivement des cellules chimiorésistantes qui surexpriment la protéine. Appelée sensibilité collatérale, ce phénomène correspond à une hypersensibilité que développent les cellules cancéreuses face à certains agents anticancéreux. Dans le cas de MRP1, il s'agit d'un transport massif de glutathion hors des cellules. Ce dernier permettant aux cellules de lutter contre les phénomènes de stress oxydant, son efflux massif conduit à la mort par apoptose des cellules cancéreuses qui surexpriment MRP1. Le vérapamil, inhibiteur de référence de la P-gp, est un inducteur de sensibilité collatérale sur des lignées cellulaires surexprimant MRP1. Malheureusement sa cytotoxicité aux concentrations utilisées empêche la poursuite de son étude. Certains flavonoïdes, tels que l'apigénine ou la

CONCLUSION GÉNÉRALE

chrysrine, se sont également révélés être de bons inducteurs de sensibilité collatérale. Dans le cadre de cette thèse, nous avons poursuivi cette étude par la conception, la synthèse et l'évaluation biologique de nouveaux dérivés de flavone comme modulateurs de la protéine MRP1. Trois grandes pharmacomodulations ont été entreprises à partir de la flavone :

- la synthèse d'homodimères de flavonoïdes ;
- l'étude de la C-alkylation et de l'O-alkylation en position 3 de la flavone ;
- l'introduction d'un groupement ferrocène à la place du cycle B de la flavone.

Alors que les deux premières pharmacomodulations citées n'ont pas permis l'obtention de nouveaux modulateurs efficaces, l'introduction d'un motif ferrocène a conduit à des résultats intéressants. Lors de cette étude, des analogues chalcones, aurones et flavones ferrocéniques ont été synthétisés. Bien que certains de ces composés étaient capables d'induire un efflux massif de glutathion, uniquement les flavones ferrocéniques, en particulier méthoxylées sur les positions 5 et/ou 7, se sont avérées également être des inducteurs de la mort sélective par apoptose des cellules chimiorésistantes surexprimant MRP1. Il sera ainsi intéressant de poursuivre l'étude de dérivés ferrocéniques.



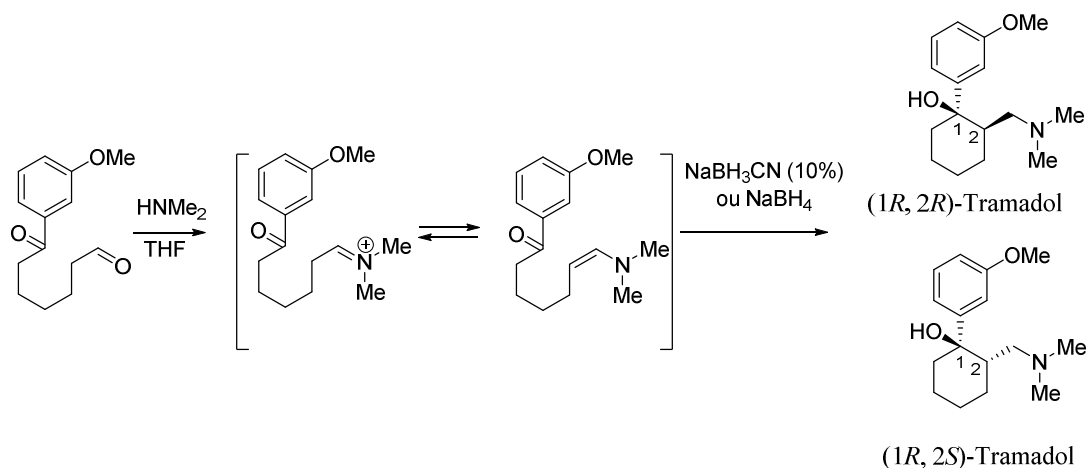
De plus, il semblerait que l'efflux de glutathion soit une condition nécessaire mais non suffisante pour l'induction de mort cellulaire sélective. Ainsi, nous pouvons ainsi supposer l'existence de différentes voies cellulaires, une impliquant MRP1 et l'efflux massif de glutathion, tandis que d'autres voies conduiraient à la mort sélective par apoptose uniquement si les cellules sont dépourvues de glutathion. Le mécanisme d'action de la sensibilité collatérale chez MRP1 est encore à étudier.

Une partie des travaux réalisés sur ce projet a fait l'objet d'un article dans le journal *Biochemical Pharmacology*.⁴⁰³

Alors que le premier volet de cette thèse porte sur la synthèse et l'étude pharmacologique de nouvelles molécules appartenant à la famille des flavonoïdes, substances d'origine naturelle, le second volet porte au contraire sur un composé synthétique bioactif, découvert en forte

CONCLUSION GÉNÉRALE

concentration dans une espèce végétale. En effet, notre laboratoire a démontré récemment l'occurrence naturelle du tramadol, médicament synthétique utilisé contre la douleur et commercialisé depuis la fin des années 1970, au sein d'un arbuste africain, le *Nauclea latifolia*. En se basant sur une voie biosynthétique plausible et validée partiellement par des analyses isotopiques fines, nous nous sommes intéressés à la synthèse biomimétique du tramadol et en particulier à une réaction de cyclisation issue de la réaction d'un énamine sur un carbonyle, étape clé de la synthèse biomimétique.



Bien qu'obtenu avec un rendement relativement faible (10%), le tramadol a tout de même pu être isolé et caractérisé par RMN et HPLC, soutenant ainsi notre hypothèse d'une origine naturelle du tramadol. Ces travaux ainsi que ceux de nos collaborateurs ont fait l'objet d'un premier article dans le journal *PNAS*⁴⁹⁸ puis d'un second article dans le journal *Chemical Communications*.⁵⁰⁵ Cependant, les études menées par l'équipe du Dr. Spiteler de Dortmund viennent remettre en question notre hypothèse, soutenant une origine anthropogénique du tramadol au sein de l'arbuste africain.⁵⁰⁶ Il sera ainsi nécessaire de compléter ces études afin de préciser et de confirmer l'origine du tramadol au sein de *Nauclea latifolia*.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

I. Material and methods

○ *Sources for the consumables*

Solvents and reagents were purchased from Sigma Aldrich (Italy), Acros Organics (France), Alfa Aesar (Germany) and TCI (Japan). They were used without purification. Anhydrous reactions were performed using oven dried glassware with anhydrous solvents under an atmosphere of dry nitrogen.

○ *Chromatography*

Reactions were monitored by thin layer chromatography (TLC) using commercial aluminium backed silica gel plates (Merck, Silica gel 60, F 254; Macherey-Nagel, Alugram® Xtra SIL G/UV 254). TLC spots were viewed under ultraviolet light at 254 and 366 nm. Purifications were performed by gravity column flash chromatography using silica gel [Macherey-Nagel 60M, 0,04-0,063 mm (200-400 mesh)] or by using Reveleris® X2 flash chromatography system with Reveleris® Flash cartridges or GraceResolv® Flash cartridges.

○ *Melting point*

Melting points (m.p.), expressed in degrees Celsius (°C), were obtained on a Büchi melting point B540.

○ *Mass spectra and elemental analysis*

Electrospray ionization ESI mass spectra were acquired by the analytical service of Département de Chimie Moléculaire, Grenoble Alpes University, on an Esquire 300 Plus

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Brüker Daltonis instrument with a nanospray inlet. Elemental Analysis were performed by the analytical service of Département de Chimie Moléculaire, Grenoble Alpes University.

○ *Nuclear magnetic resonance spectra*

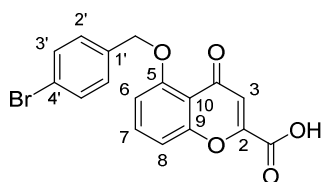
^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on a Bruker Advance 400 spectrometer (400 MHz or 500 MHz for ^1H and 100 MHz for ^{13}C NMR). Chemical shifts are given in ppm (δ) and were referenced to the internal solvent signal. Multiplicities are reported as follows: s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), dd (doublet of doublet), ddd (doublet of doublet of doublet), dt (doublet of triplet), m (multiplet). Coupling constants J are given in Hertz.

II. Synthesis protocols

II.1. SYNTHESIS OF ABCG2 DERIVATIVES

II.1.1. NMR analysis

Interpretation of ^1H and ^{13}C NMR spectra of many compounds were supported by the resolution of 2D COSY, HSQC and HMBC spectra of compounds 5-(4'-bromobenzyloxy)-4-oxo-4*H*-chromene-2-carboxylic acid (**3**) and 5-methoxytryptamine hydrochloride. Protons and carbons of **3** are numbered as below:



From ^1H and ^{13}C NMR (**Figure 138** and **Figure 139**), 2D HSQC (**Figure 140**) and HMBC (**Figure 141**) spectra of **3**, the complete ^1H and ^{13}C assignments are given in **Table 38** and **Table 39**.

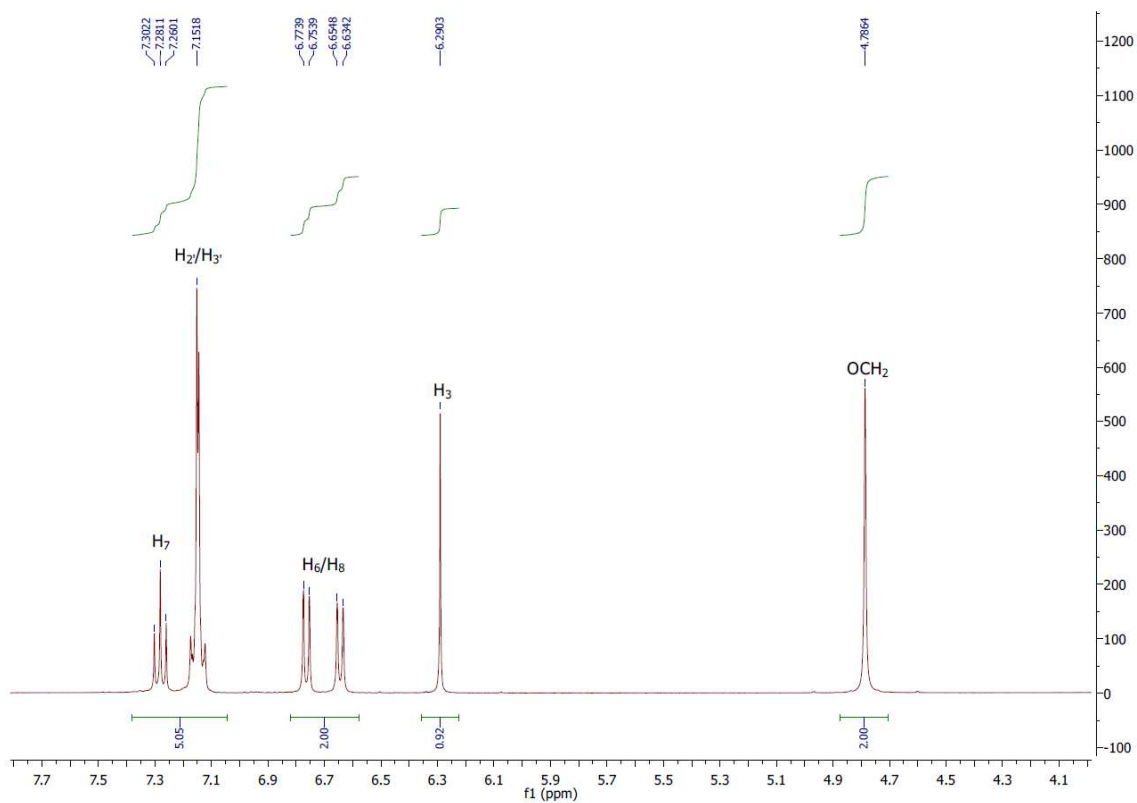


Figure 138 : ¹H NMR spectrum of **3** in DMSO-d₆.

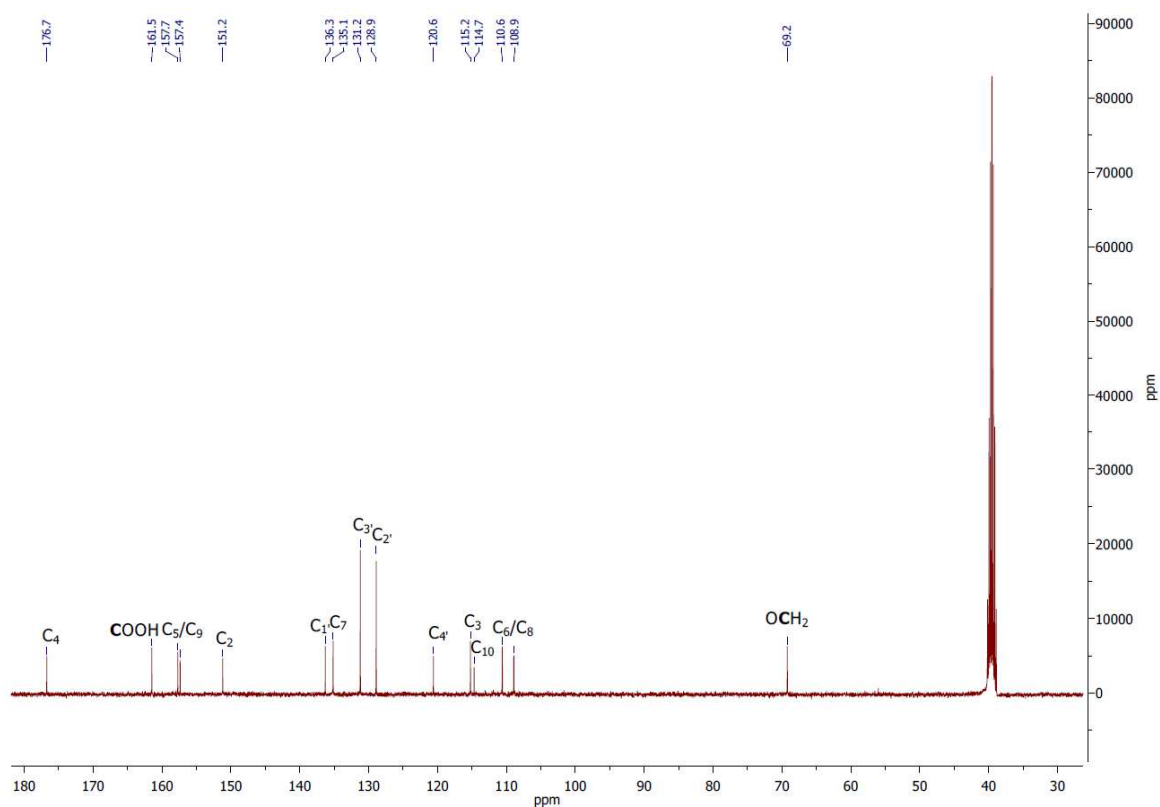


Figure 139 : ¹³C NMR spectrum of **3** in DMSO-d₆.

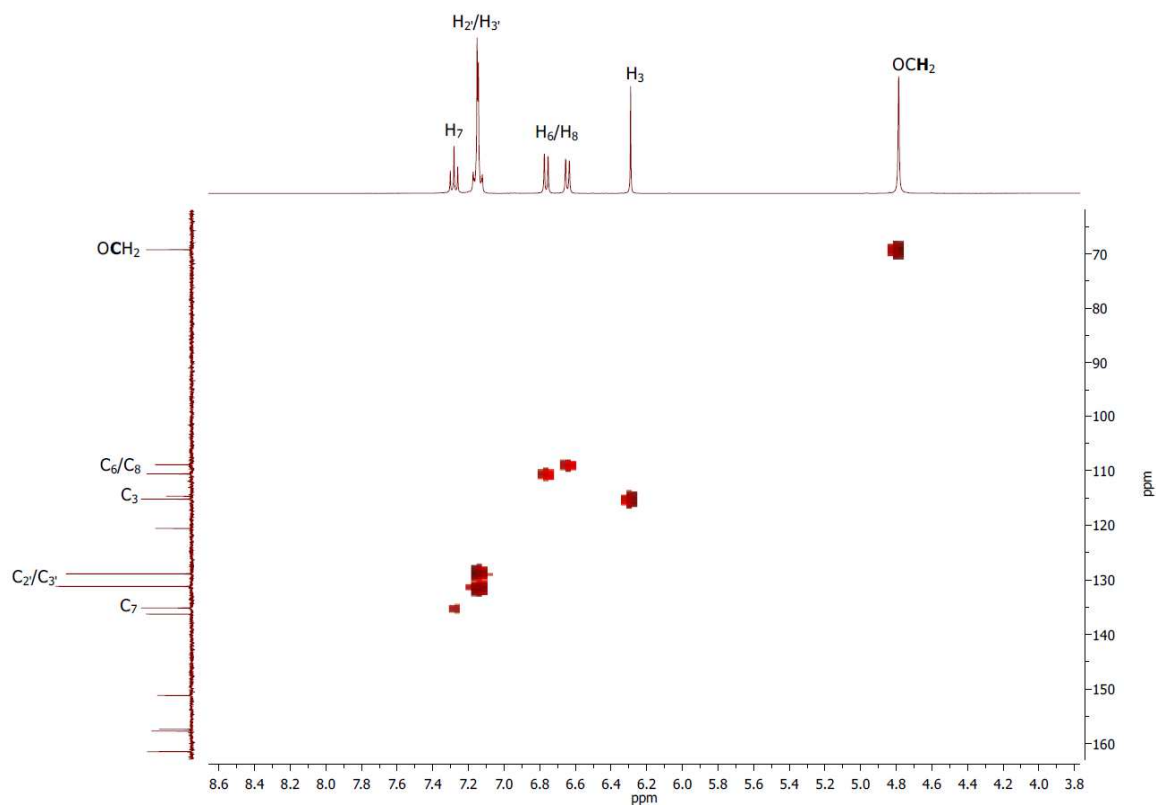


Figure 140 : 2D HSQC spectrum of **3** in DMSO-d₆.

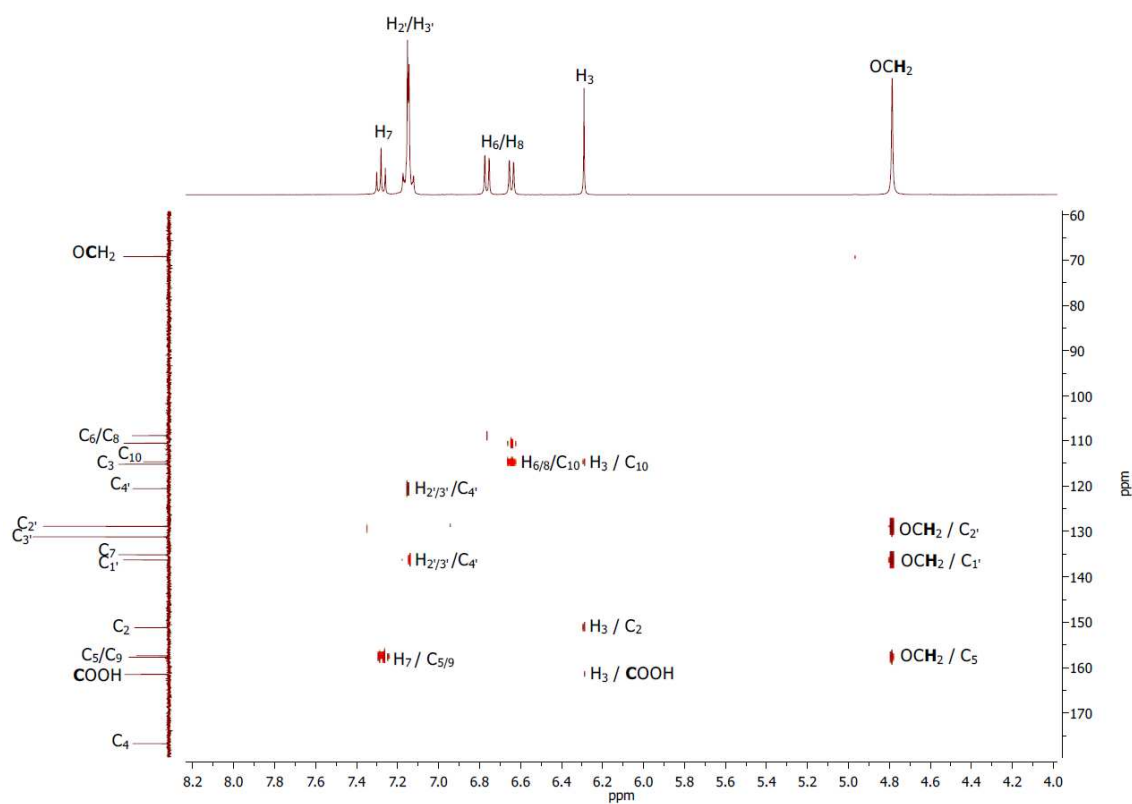


Figure 141 : 2D HMBC spectrum of **3** in DMSO-d₆.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

H ₃	H ₆ /H ₈	H ₇	H ₂ /H ₃ '	OCH ₂
6.29 s	6.64 d (8.2 Hz) 6.76 d (8.0 Hz)	7.28 t (8.4 Hz)	7.15 m	4.79 s

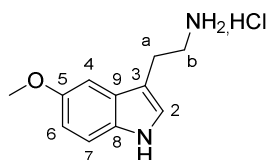
Table 38 : The ¹H chemical shifts (δ, ppm) multiplicities and coupling constants (*J*, Hertz in parenthesis) of **3** in DMSO-d₆.

Note: The signal of H₇ is a doublet of doublet appearing as a triplet on the spectrum. Thus, this signal is assigned as a triplet in the experimental part.

C ₂	C ₃	C ₄	C ₅ /C ₉	C ₆ /C ₈	C ₇	C ₁₀	C ₁ '	C ₂ '/C ₃ '	C ₄ '	OCH ₂	COOH
151.2	115.2	176.7	157.4 157.7	108.9 110.6	135.1	114.7	136.3	128.9 131.2	120.6	69.2	161.5

Table 39 : The ¹³C chemical shifts (δ, ppm) of **3** in DMSO-d₆.

We did the same analysis for the commercially available 5-methoxytryptamine hydrochloride. Protons and carbons are numbered as below:



From ¹H and ¹³C NMR (**Figure 142** and **Figure 143**), 2D COSY (**Figure 144**), HSQC (**Figure 145**) and HMBC (**Figure 146**) spectra of 5-methoxytryptamine hydrochloride, the complete ¹H and ¹³C assignments are given in **Table 40** and **Table 41**.

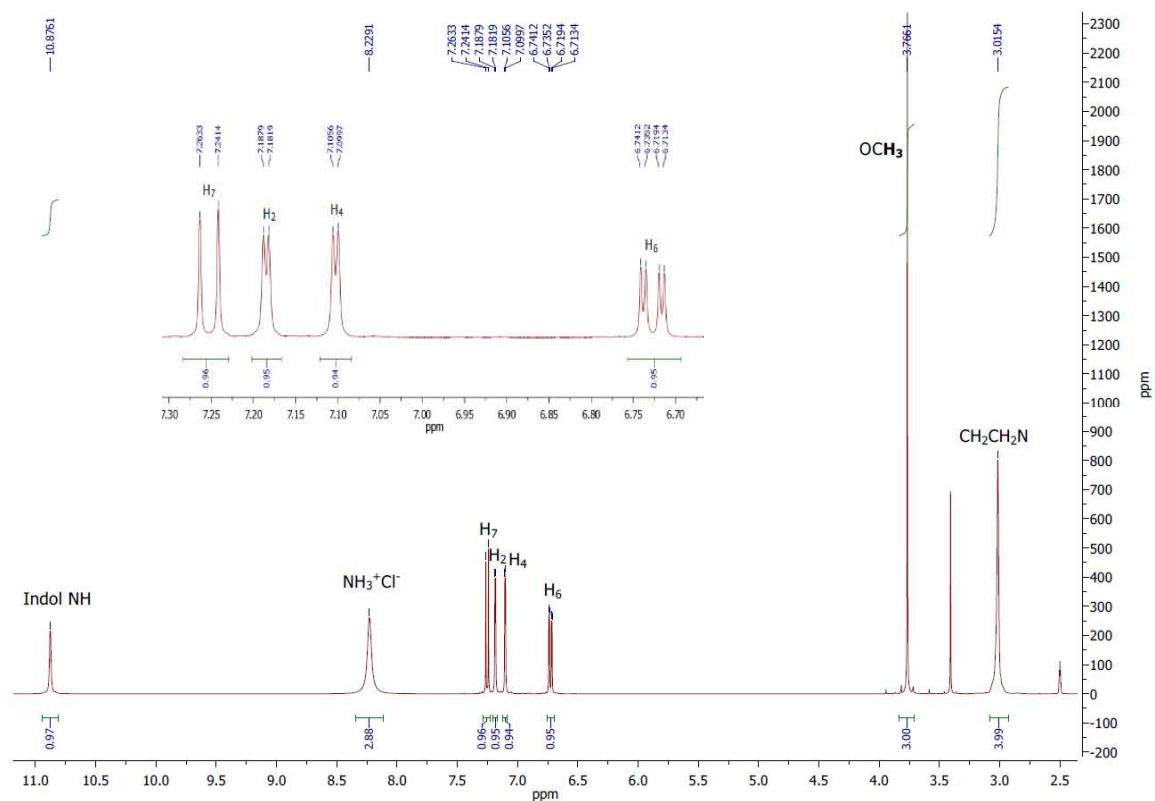


Figure 142 : ^1H NMR spectrum of 5-methoxytryptamine hydrochloride in DMSO-d_6 .

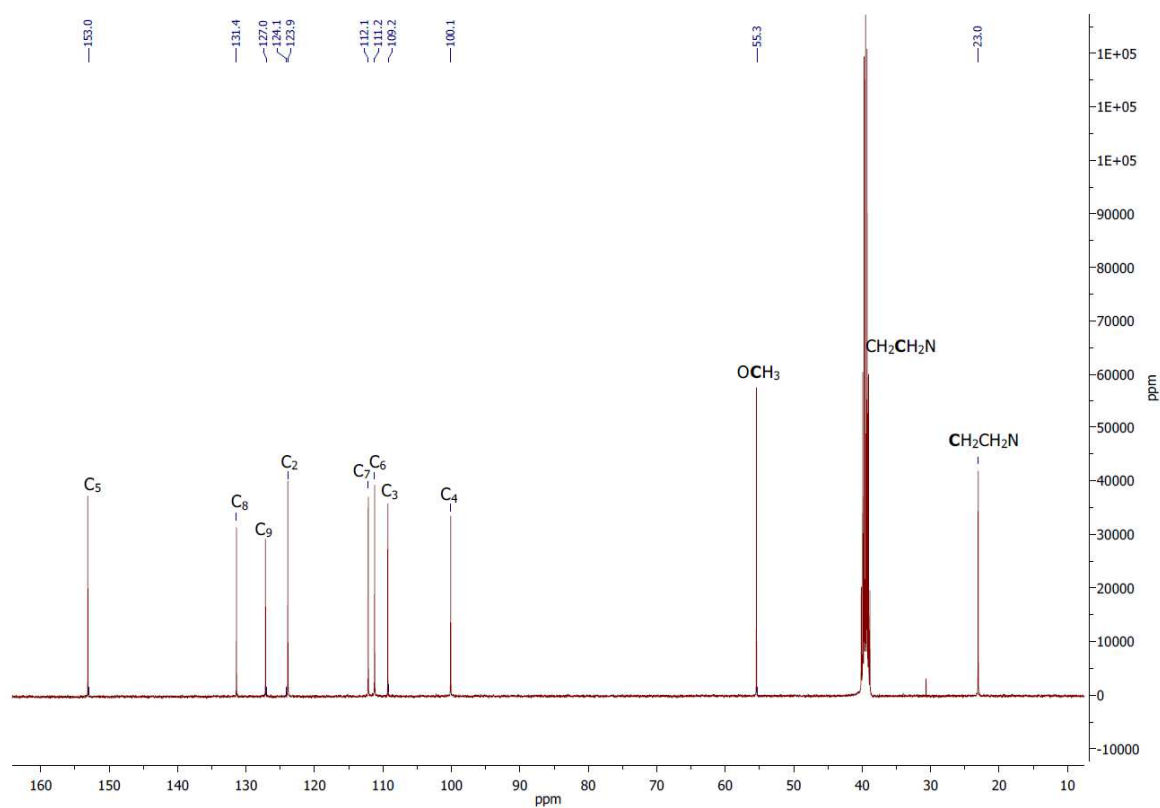


Figure 143 : ^{13}C NMR spectrum of 5-methoxytryptamine hydrochloride in DMSO-d_6 .

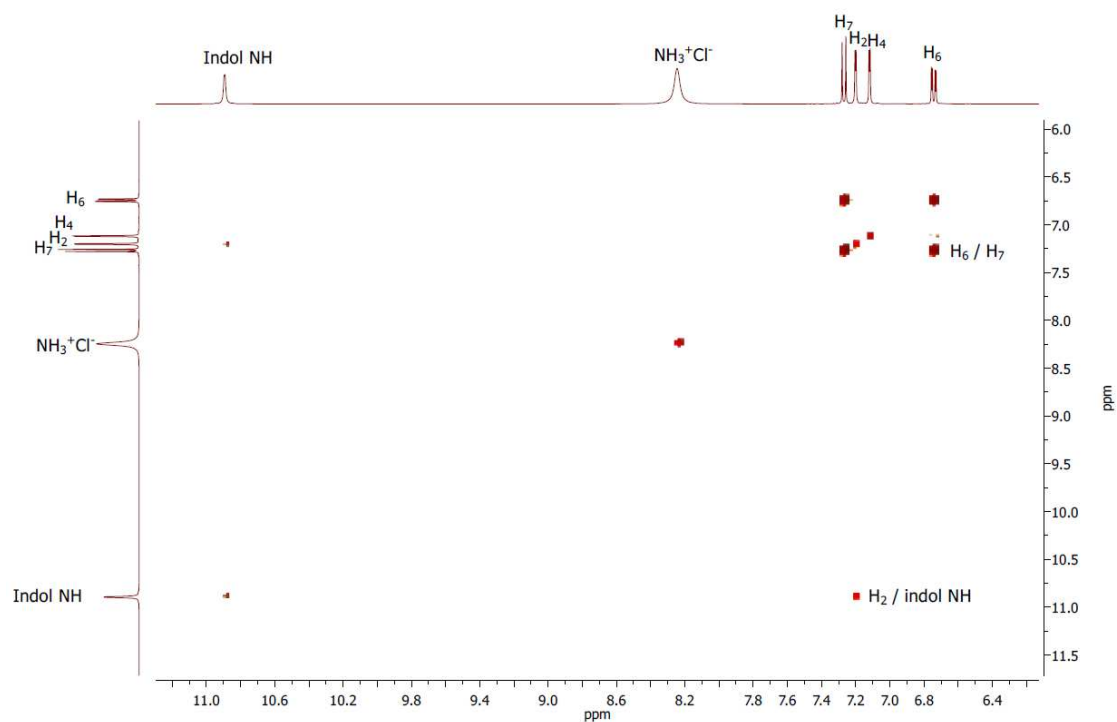


Figure 144 : 2D COSY spectrum of 5-methoxytryptamine hydrochloride in DMSO-d₆.

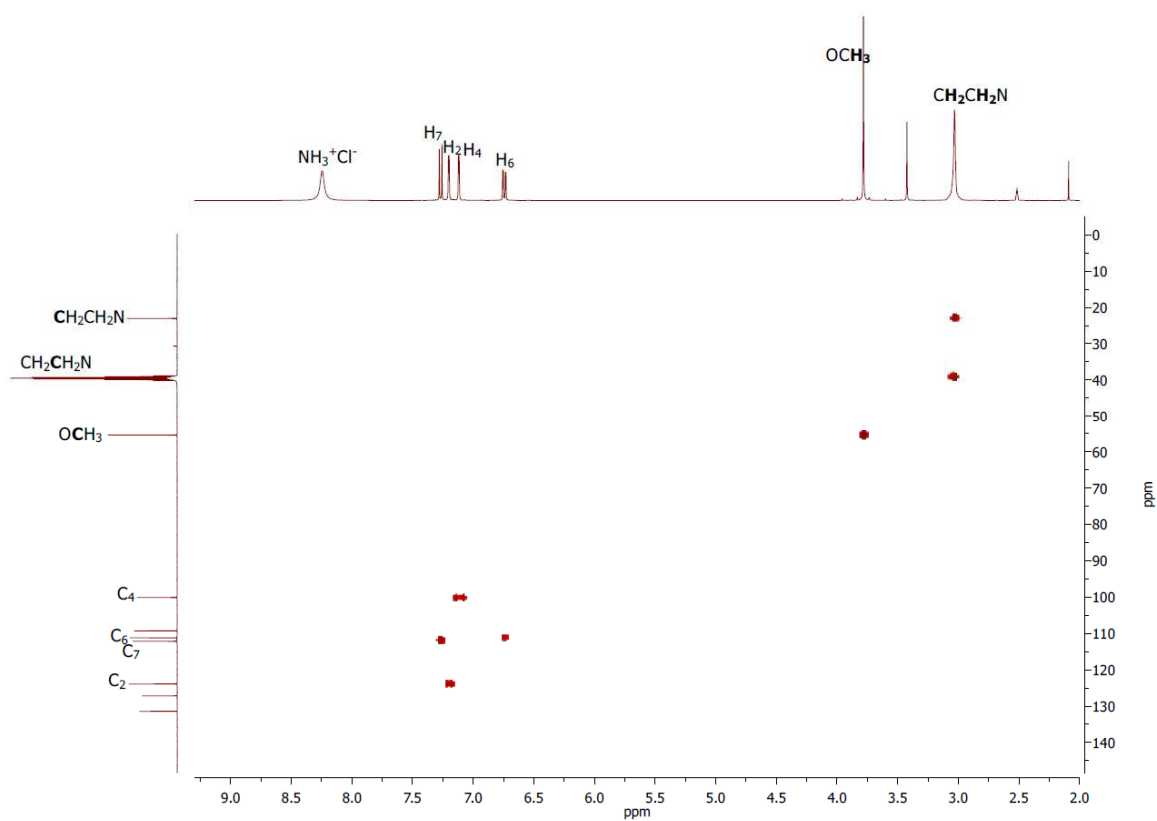


Figure 145 : 2D HSQC spectrum of 5-methoxytryptamine hydrochloride in DMSO-d₆.

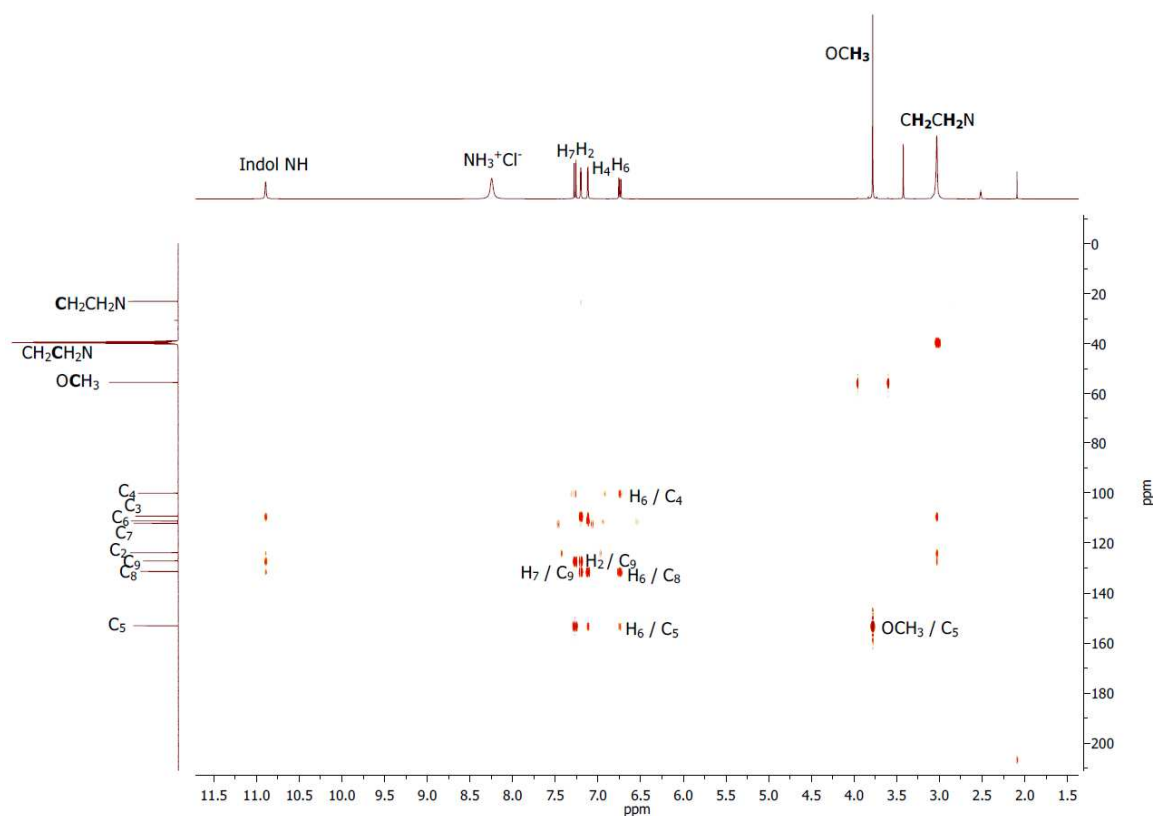


Figure 146 : 2D HMBC spectrum of 5-methoxytryptamine hydrochloride in DMSO-d₆.

H ₂	H ₄	H ₆	H ₇	CH ₂ CH ₂ N	OCH ₃
7.18 d (2.4 Hz)	7.10 d (2.4 Hz)	6.72 dd (2.4 Hz, 8.7 Hz)	7.25 d (8.7 Hz)	3.01 s	3.77 s

Table 40 : The ¹H chemical shifts (δ, ppm) multiplicities and coupling constants (*J*, Hertz in parenthesis) of 5-methoxytryptamine hydrochloride in DMSO-d₆.

C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	CH ₂ CH ₂ N	CH ₂ CH ₂ N	OCH ₃
123.9	109.2	100.1	153.0	111.2	112.1	131.4	127.0	23.0	Under peak of DMSO	55.3

Table 41 : The ¹³C chemical shifts (δ, ppm) of 5-methoxytryptamine hydrochloride in DMSO-d₆.

II.1.2. General procedures

General procedure A. A solution of dihydroxyacetophenone (1 equiv.), potassium carbonate (6 equiv.) and tetrabutylammonium bromide (0.35 equiv.) in acetone (7 mL/mmol) was refluxed for 20 min. A solution of halogenated derivative (1.2 equiv.) in acetone (3 mL /mmol) was added dropwise and the resulting mixture was refluxed for 2-6 h. The resulting

PARTIE EXPÉRIMENTALE

solution was cooled to room temperature and concentrated under reduced pressure. The residue was poured into water and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with water, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure.

General procedure B. To a solution of sodium (6 equiv.) in a mixture of THF/anhydrous EtOH (1/1, 10 mL/mmol) under argon were added alkylated derivative (1 equiv.) and diethyloxalate (4 equiv.). The resulting mixture was refluxed for 2 h. The solution was cooled to room temperature and concentrated under reduced pressure. The residue was poured into 1M hydrochloric acid and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with water, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved in THF/EtOH (1/1, 10 mL/mmol) and 37% hydrochloric acid (1 mL/mmol) was added dropwise. The resulting mixture was refluxed for 2 h. The solution was cooled to room temperature and concentrated under reduced pressure. The residue was poured into water and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with water, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure.

General procedure C. To a solution of ethyl ester (1 equiv.) in THF/EtOH (1/1, 9 mL/mmol) were added a solution of sodium bicarbonate (7%, 4 mL/mmol) and water (4 mL/mmol). The resulting mixture was refluxed for 2 h. The solution was cooled to room temperature and poured into 1M hydrochloric acid in order to form a solid which was filtered and washed with diethyl ether.

General procedure D₁. To a solution of tryptamine derivative (1 equiv.) in DMF (10 mL/mmol) were added successively a solution of acid derivative (1 equiv.) in DMF (10 mL/mmol), HOBt (2 equiv.), triethylamine (4 equiv.) and EDCI (2 equiv.). The mixture was stirred overnight at room temperature. The resulting mixture was poured into 1M hydrochloric acid and extracted with dichloromethane. The combined organic layers were washed with sodium bicarbonate and water, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

General procedure D₂. To a solution of acid derivative (1 equiv.) in DMF (10 mL/mmol) were added successively a solution of tryptamine derivative (2 equiv.) in DMF (10 mL/mmol), TBTU (1.5 equiv.) and DIEA (5 equiv.). The mixture was stirred overnight at room temperature. The resulting mixture was poured into sodium bicarbonate and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with water, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure.

General procedure D₃. To a solution of tryptamine derivative (1 equiv.) in DMF (10 mL/mmol) were added successively a solution of acid derivative (1 equiv.) in DMF (10 mL/mmol), triethylamine (4 equiv.), EDCI (2 equiv.) and ethyl isonitrosocanoacetate (2 equiv.). The mixture was stirred overnight at room temperature. The resulting mixture was poured into 1M hydrochloric acid and extracted with dichloromethane. The combined organic layers were washed with sodium bicarbonate and water, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure.

General procedure E. A solution of **17b** (1 equiv.), potassium bicarbonate (3 equiv.) and an excess of tetrabutylammonium bromide in acetone (80 mL/mmol) was refluxed for 15 min and halogenated derivative (1 equiv.) was added dropwise. The resulting mixture was refluxed for 5 h. The solution was poured into water and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with water, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure.

General procedure F. To a solution of tryptamine (1 equiv.) and triethylamine (2 equiv.) in dichloromethane (8 mL/mmol) was added dropwise ethylchloroformate (1 equiv.). The resulting mixture was stirred at room temperature for 20 min. The solution was poured into water and extracted with dichloromethane. The combined organic layers were washed with 1M hydrochloric acid and water, dried over anhydrous magnesium sulfate and concentrated under reduced pressure.

General procedure G. A solution of ethoxycarbonyltryptamine derivative (1 equiv.) and LiAlH₄ (6 equiv.) in dry THF (10 mL/mmol) was refluxed for 16 h. The resulting mixture was cooled to room temperature and hydrolyzed with water (n ml/n g LiAlH₄), 15% sodium hydroxide (n ml/ n g LiAlH₄) and water (3n ml/ n g LiAlH₄). The mineral precipitates of

PARTIE EXPÉRIMENTALE

LiOH and $\text{Al}(\text{OH})_3$ were removed by filtration and the filtrate was concentrated under reduced pressure.

General procedure H. A solution of protected tryptamine derivative (1 equiv.) in dichloromethane (5 mL/mmol) with sodium hydroxide (4 equiv.) and tetrabutylammonium bromide (cat.) was stirred at 0°C for 30 min. Then dimethylsulfate (1.5 equiv.) was added and the resulting mixture was stirred at room temperature for 16 h. The mixture was poured into water and extracted with dichloromethane. The combined organic layer was washed with 1M hydrochloric acid and water, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure.

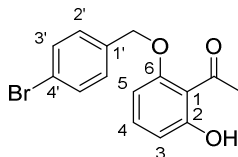
General procedure I. To a solution of propargylic derivative (1 equiv.) in DMF (30 mL/mmol) were added azide (1.2 equiv.), sodium ascorbate (0.2 equiv.), and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.1 equiv.). The resulting mixture was stirred at room temperature for 24 h. The solution was poured into water and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with water, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure.

General procedure J. A mixture of tryptamine derivative and tosylate derivative was stirred in DMF (10 mL/mmol) at room temperature for 24 h. The mixture was poured into water and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with water, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure.

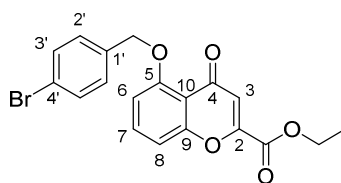
General procedure K. To a solution of methyl ester derivative (1 equiv.) in tetrahydrofuran/methanol (1/1) (10 mL/mmol) was added a solution of lithium hydroxide (1 equiv.) in water (5 mL/mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature for 1 h. The solution was poured into 1M hydrochloric acid and extracted with dichloromethane. The combined organic layers were washed with water, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure.

II.1.3. Synthesis protocols for ABCG2 derivatives

II.1.3.1 Synthesis of MBL-II-141 (5-(4'-Bromobenzyloxy)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid [2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)-ethyl]-amide)

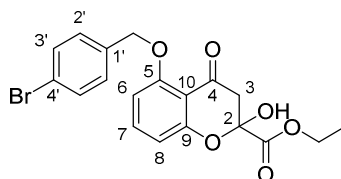


6-(4'-Bromobenzyloxy)-2-hydroxyacetophenone (1). The crude was prepared according to general procedure A starting from commercially available 2,6-dihydroxyacetophenone (2 g, 13 mmol) and 4-bromobenzyloxybromide (4 g, 16 mmol) and was triturated in diethyl ether to afford **1** as a white solid (2.8 g, 68%). $C_{15}H_{13}BrO_3$. **m.p.** 116-117°C. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.50 (s, 3H, $COCH_3$), 5.15 (s, 2H, OCH_2), 6.54 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H_3), 6.63 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H_5), 7.31 (t, 1H, $J = 8.0$ Hz, H_4), 7.44 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, $H_{2'}$), 7.61 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, $H_{3'}$), 11.71 (s, 1H OH). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 33.0 ($COCH_3$), 69.3 (OCH_2), 103.4 (C_5), 109.7 (C_3), 114.7 (C_1), 121.2 ($C_{4'}$), 129.9 ($C_{2'}$), 131.4 ($C_{3'}$), 133.8 (C_4), 135.9 ($C_{1'}$), 158.0 (C_6), 159.6 (C_2), 203.4 (CO). **MS** (ESI) m/z 320 (^{79}Br), 322 (^{81}Br) [M] $^+$.

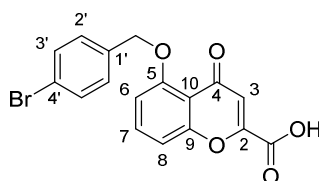


5-(4'-Bromobenzyloxy)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid ethyl ester (2). The crude was prepared according to general procedure B from **1** (2 g, 6.2 mmol) and was washed with diethyl ether to afford **2** as a yellow solid (1.7 g, 69%). $C_{19}H_{15}BrO_5$. **m.p.** 151-153°C. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 1.34 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz, OCH_2CH_3), 4.38 (q, 2H, $J = 7.1$ Hz, OCH_2CH_3), 5.25 (s, 2H, OCH_2), 6.78 (dd, 1H, $J = 0.8$ Hz, $J = 7.9$ Hz, H_6), 7.11 (s, 1H, H_3), 7.24 (dd, 1H, $J = 0.8$ Hz, $J = 8.5$ Hz, H_8), 7.60 (m, 4H, $H_{2'}$, $H_{3'}$), 7.75 (t, 1H, $J = 8.4$ Hz, H_7). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 13.9 (OCH_2CH_3), 62.6 (OCH_2CH_3), 69.2 (OCH_2), 109.0 and 110.5 (C_6 and C_8), 114.7 (C_{10}), 115.4 (C_3), 120.6 ($C_{4'}$), 128.9 ($C_{2'}$), 131.2 ($C_{3'}$), 135.3

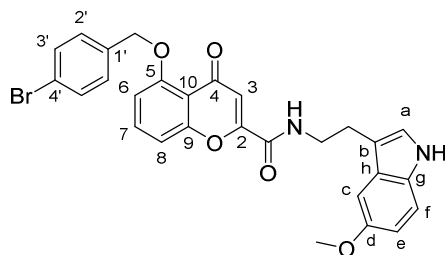
(C_7), 136.2 ($C_{1'}$), 150.2 (C_2), 157.2 and 157.7 (C_5 and C_9), 160.0 (CO), 176.4 (C_4). **MS** (ESI) m/z 402 (^{79}Br), 404 (^{81}Br) [M] $^+$.



5-(4'-Bromobenzyloxy)-2-hydroxy-4-oxochromane-2-carboxylic acid ethyl ester (2'). The crude was isolated after the condensation of **2** and was purified by flash silica column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (7:3) as eluent to afford **2'** as a yellow solid. $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{BrO}_6$. **m.p.** 115-117°C. ^1H **NMR** (400 MHz, DMSO-d_6) δ 1.22 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz, OCH_2CH_3), 2.77 (d, 1H, $J = 15.9$ Hz, H_3), 3.22 (dd, 1H, $J = 1.8$ Hz, $J = 15.9$ Hz, H_3), 4.20 (q, 2H, $J = 7.1$ Hz, OCH_2CH_3), 5.17 (s, 2H, OCH_2), 6.64 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz, H_6 ou H_8), 6.78 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, H_6 ou H_8), 7.47-7.61 (m, 5H, H_7 , $H_{2'}$, $H_{3'}$), 8.15 (s, 1H, OH). ^{13}C **NMR** (100 MHz, DMSO-d_6) δ 13.9 (OCH_2CH_3), 46.3 (C_3), 61.8 (OCH_2CH_3), 68.9 (OCH_2), 98.0 (C_2), 106.4 and 110.3 (C_6 and C_8), 110.6 (C_{10}), 120.6 ($C_{4'}$), 128.9 ($C_{2'}$), 131.2 ($C_{3'}$), 136.2 and 136.5 (C_7 and $C_{1'}$), 158.2 and 158.8 (C_5 and C_9), 167.5 (CO), 187.5 (C_4). **MS** (ESI) m/z 419 (^{79}Br), 421 (^{81}Br) [M-H] $^-$; 443 (^{79}Br), 445 (^{81}Br) [M+Na] $^+$.

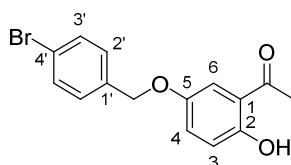


5-(4'-Bromobenzyloxy)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid (3). The crude was prepared according to general procedure C from **2** (1.7 g, 4.3 mmol) to afford **3** as a white solid (1.5 g, 90%). $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{BrO}_5$. **m.p.** >200°C (decomposition). ^1H **NMR** (400 MHz, DMSO-d_6) δ 4.79 (s, 2H, OCH_2), 6.29 (s, 1H, H_3), 6.64 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, H_6 or H_8), 6.76 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H_6 or H_8), 7.15 (m, 4H, $H_{2'}$, $H_{3'}$), 7.28 (t, 1H, $J = 8.4$ Hz, H_7). ^{13}C **NMR** (100 MHz, DMSO-d_6) δ 69.2 (OCH_2), 108.9 and 110.6 (C_6 and C_8), 114.7 (C_{10}), 115.2 (C_3), 120.6 ($C_{4'}$), 128.9 ($C_{2'}$), 131.2 ($C_{3'}$), 135.1 (C_7), 136.3 ($C_{1'}$), 151.2 (C_2), 157.4 and 157.7 (C_5 and C_9), 161.5 (CO), 176.7 (C_4). **MS** (ESI) m/z 374 (^{79}Br), 476 (^{81}Br) [M] $^+$.



5-(4'-Bromobenzyloxy)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid [2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)-ethyl]-amide (MBL-II-141). The crude was prepared according to general procedure D₁ from **3** (860 mg, 2.3 mmol) and 5-methoxytryptamine hydrochloride (430 g, 2.3 mmol) and was purified by flash silica column chromatography using dichloromethane/ethyl acetate (9:1) as eluent to afford **MBL-II-141** as a beige powder (566 mg, 45%). C₂₈H₂₃BrN₂O₅. **mp** 159-160 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.95 (t, 2H, *J* = 7.8 Hz, NHCH₂CH₂), 3.56 (q, 2H, *J* = 7.5 Hz, NHCH₂CH₂), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 5.25 (s, 2H, OCH₂), 6.67 (s, 1H, *H*₃), 6.71 (dd, 2H, *J* = 2.4 Hz, *J* = 8 Hz, *H*_e), 7.07-7.26 (5H, m, *H*₆, *H*₈, *H*_a, *H*_c, *H*_f), 7.60 (m, 4H, *H*₂, *H*₃), 7.76 (t, 1H, *J* = 8.4 Hz, *H*₇), 9.18 (t, 1H, *J* = 5.8 Hz, CONH), 10.68 (s, 1H, indole NH). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 24.9 (NHCH₂CH₂), under peak of DMSO (NHCH₂CH₂), 55.3 (OCH₃), 69.2 (OCH₂), 100.2 (*C*_c), 109.0 and 110.6 (*C*₆ and *C*₈), 111.1 and 111.2 (*C*_b and *C*_f), 112.1 (*C*_e and *C*₃), 114.5 (*C*₁₀), 120.6 (*C*₄), 123.4 (*C*_a), 127.5 (*C*_h), 128.9 (*C*₂), 131.2 (*C*₃), 131.4 (*C*_g), 135.0 (*C*₇), 136.3 (*C*₁), 153.0 and 153.6 (*C*₂ and *C*_d), 157.0 and 157.7 (*C*₅ and *C*₉), 158.9 (CO), 176.6 (*C*₄). **MS** (ESI) *m/z* 546 (⁷⁹Br), 548 (⁸¹Br) [M]⁺. **Anal.** Calcd for C₂₈H₂₃BrN₂O₅: C, 61.44; H, 4.24; N, 5.12. Found C, 61.38; H, 4.23; N, 5.108.

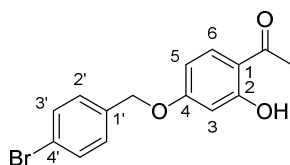
II.1.3.2 Modulation of para-bromobenzyloxy group position– Synthesis of compounds **7a** and **7b**



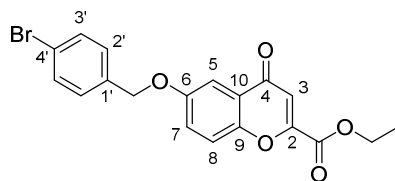
5-(4'-Bromobenzyloxy)-2-hydroxyacetophenone (4a). The crude was prepared according to general procedure A starting from commercially available 2,5-dihydroxyacetophenone (2 g, 13 mmol) and 4-bromobenzyloxybromide (4 g, 16 mmol), and was recrystallized in ethanol to afford **4a** as a beige solid. (1.7 g, 40%). C₁₅H₁₃BrO₃. **m.p.** 87-89°C. ¹H NMR (400 MHz,

PARTIE EXPÉRIMENTALE

DMSO- d_6) δ 2.63 (s, 3H, COCH₃), 5.08 (s, 2H, OCH₂), 6.90 (d, 1H, J = 9.0 Hz, H_3), 7.24 (dd, 1H, J = 3.1 Hz, J = 9.0 Hz, H_4), 7.41 (m, 3H, H_2 , H_2'), 7.59 (d, 2H, J = 6.6 Hz, H_3'), 11.46 (s, 1H, OH). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 27.8 (COCH₃), 69.1 (OCH₂), 115.2 (C_3), 118.4 (C_6), 120.1 and 120.8 (C_1 and C_4'), 124.3 (C_4), 129.7 (C_2'), 131.2 (C_3'), 136.4 (C_1'), 150.2 (C_5), 155.0 (C_2), 203.6 (CO). MS (ESI) m/z 319 (^{79}Br), 321 (^{81}Br) [M-H] $^-$.



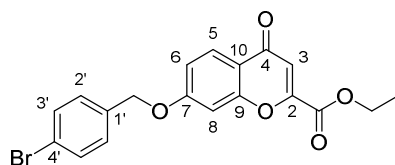
4-(4'-Bromobenzyloxy)-2-hydroxyacetophenone (4b). The crude was prepared according to general procedure A starting from commercially available 2,4-dihydroxyacetophenone (2 g, 13 mmol) and 4-bromobenzyloxybromide (4 g, 16 mmol) and was recrystallized in ethanol to afford **4b** as a beige solid (3.6 g, 87%). C₁₅H₁₃BrO₃. **m.p.** 143-144°C. ^1H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 2.56 (s, 3H, COCH₃), 5.04 (s, 2H, OCH₂), 6.50 (m, 2H, H_3 and H_5), 7.29 (d, 2H, J = 8.4 Hz, H_2'), 7.52 (d, 2H, J = 8.4 Hz, H_3'), 7.64 (d, 1H, J = 8.8 Hz, H_6), 12.72 (s, 1H, OH). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 26.6 (COCH₃), 68.7 (OCH₂), 101.7 (C_3), 107.7 (C_5), 114.0 (C_1), 121.1 (C_4'), 129.8 (C_2'), 131.4 (C_3'), 133.3 (C_6), 135.7 (C_1'), 163.9 (C_4), 164.4 (C_2), 203.1 (CO). MS (ESI) m/z 319 (^{79}Br), 321 (^{81}Br) [M-H] $^-$.



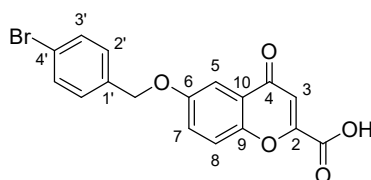
6-(4'-Bromobenzyloxy)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid ethyl ester (5a). The crude was prepared according to general procedure B starting from **4a** (2.2 g, 6.8 mmol) and was washed with diethyl ether to afford **5a** as a beige solid (820 mg, 30%). C₁₉H₁₅BrO₅. **m.p.** 146-148°C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 1.43 (t, 3H, J = 7.1 Hz, OCH₂CH₃), 4.46 (q, 2H, J = 7.1 Hz, OCH₂CH₃), 5.10 (s, 2H, OCH₂), 7.11 (s, 1H, H_3), 7.33 (m, 2H, H_2'), 7.50 (d, 1H, J = 3.1 Hz, H_5), 7.54 (dd, 1H, J = 3.1 Hz, J = 9.1 Hz, H_7), 7.60 (m, 2H, H_3'), 7.75 (d, 1H, J = 9.1 Hz, H_8). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 13.9 (OCH₂CH₃), 62.6 (OCH₂CH₃), 69.0 (OCH₂), 105.9 (C_5), 112.8 (C_3), 120.7 (C_8), 121.1 (C_4'), 124.6 (C_{10}), 125.0 (C_7), 129.8 (C_2'),

PARTIE EXPÉRIMENTALE

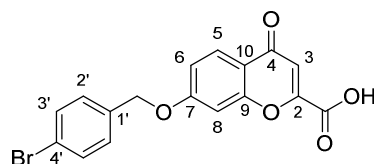
131.4 ($C_{3'}$), 135.9 ($C_{1'}$), 150.2 (C_9), 152.0 and 155.9 (C_2 and C_6), 160.0 (CO), 176.9 (C_4). **MS** (ESI) m/z 403 (^{79}Br), 405 (^{81}Br) [$\text{M}+\text{H}$] $^+$; 425 (^{79}Br), 427 (^{81}Br) [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$.



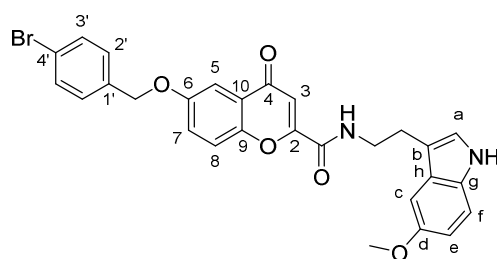
7-(4'-Bromobenzyloxy)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid ethyl ester (5b). The crude was prepared according to general procedure B starting from **4b** (1 g, 3.1 mmol) and was washed with diethyl ether to afford **5b** as a grey solid (1 g, 80%). $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{BrO}_5$. **m.p.** 179-181°C. **^1H NMR** (400 MHz, DMSO-d_6) δ 1.34 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz, OCH_2CH_3), 4.39 (q, 2H, $J = 7.1$ Hz, OCH_2CH_3), 5.29 (s, 2H, OCH_2), 6.89 (s, 1H, H_3), 7.18 (dd, 1H, $J = 2.3$ Hz, $J = 8.8$ Hz, H_6), 7.33 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz, H_8), 7.44 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz, $H_{2'}$), 7.61 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz, $H_{3'}$), 7.96 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz, H_5). **^{13}C NMR** (100 MHz, DMSO-d_6) δ 13.9 (OCH_2CH_3), 62.6 (OCH_2CH_3), 69.3 (OCH_2), 102.0 (C_8), 114.0 (C_3), 116.3 (C_6), 117.9 (C_{10}), 121.29 ($C_{4'}$), 126.5 (C_5), 129.9 ($C_{2'}$), 131.5 ($C_{3'}$), 135.5 ($C_{1'}$), 152.0 (C_2), 157.2 and 160.0 (C_7 and C_9), 163.4 (CO), 176.3 (C_4). **MS** (ESI) m/z 403 (^{79}Br), 405 (^{81}Br) [$\text{M}+\text{H}$] $^+$.



6-(4'-Bromobenzyloxy)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid (6a). The crude was prepared according to general procedure C starting from **5a** (1 g, 2.5 mmol) and was washed with diethyl ether to afford **6a** as a beige solid. (450 mg, 47%). $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{BrO}_5$. **m.p.** 252-254°C. **^1H NMR** (400 MHz, DMSO-d_6) δ 5.22 (s, 2H, OCH_2), 6.88 (s, 1H, H_3), 7.45 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, $H_{2'}$), 7.49 (d, 1H, $J = 3.1$ Hz, H_5), 7.54 (dd, $J = 3.1$ Hz, $J = 9.2$ Hz, H_7), 7.60 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, $H_{3'}$), 7.72 (d, 1H, $J = 9.1$ Hz, H_8). **^{13}C NMR** (100 MHz, DMSO-d_6) δ 69.0 (OCH_2), 105.9 (C_8), 112.4 (C_3), 120.6 (C_8), 121.1 ($C_{4'}$), 124.5 (C_{10}), 124.9 (C_7), 129.8 ($C_{2'}$), 131.4 ($C_{3'}$), 136.0 ($C_{1'}$), 150.3 (C_9), 155.8 (C_2 and C_6), 161.4 (CO), 177.3 (C_4). **MS** (ESI) m/z 373 (^{79}Br), 375 (^{81}Br) [$\text{M}-\text{H}$] $^-$.



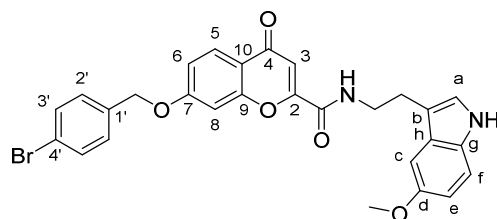
7-(4'-Bromobenzyloxy)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid (6b). The crude was prepared according to general procedure C starting from **5b** (700 mg, 1.7 mmol) and was washed with diethyl ether to afford **6b** as a grey solid (457 mg, 70%). $C_{17}H_{11}BrO_5$. **m.p.** 226–228°C. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 5.29 (s, 2H, OCH_2), 6.84 (s, 1H, H_3), 7.17 (dd, 1H, $J = 2.2$ Hz, $J = 8.8$ Hz, H_6), 7.33 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz, H_8), 7.44 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz, H_2), 7.61 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz, H_3), 7.96 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz, H_5). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 69.3 (OCH_2), 102.0 (C_8), 113.6 (C_3), 116.0 (C_6), 117.8 (C_{10}), 121.3 ($C_{4'}$), 126.4 (C_5), 129.9 ($C_{2'}$), 131.5 ($C_{3'}$), 135.5 ($C_{1'}$), 153.2 (C_2), 157.3 (C_7), 161.4 (C_9), 163.2 (CO), 176.6 (C_4). **MS** (ESI) m/z 373 (^{79}Br), 375 (^{81}Br) $[M-H]^-$.



6-(4'-Bromobenzyloxy)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid [2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)-ethyl]-amide (7a). The crude was prepared according to general procedure D₁ starting from **6a** (450 mg, 1.2 mmol) and was washed with diethyl ether to afford **7a** as a white solid (269 mg, 41%). $C_{28}H_{23}BrN_2O_5$. **m.p.** 192–194°C. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.96 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz, $NHCH_2CH_2$), 3.57 (q, 2H, $J = 6.9$ Hz, $NHCH_2CH_2$), 3.73 (s, 3H, OCH_3), 5.23 (s, 2H, OCH_2), 6.71 (dd, 1H, $J = 2.4$ Hz, $J = 8.8$ Hz, H_e), 6.81 (s, 1H, H_3), 7.08 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz, H_c), 7.17 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz, H_a), 7.23 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz, H_f), 7.46 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, H_2), 7.51 (d, 1H, $J = 3.2$ Hz, H_5), 7.58 (dd, 1H, $J = 3.2$ Hz, $J = 9.2$ Hz, H_7), 7.62 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, H_3), 7.69 (d, 1H, $J = 9.2$ Hz, H_8), 9.24 (t, 1H, $J = 5.6$ Hz, CONH), 10.69 (s, 1H, indole NH). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 24.9 ($NHCH_2CH_2$), under DMSO peak ($NHCH_2CH_2$), 55.3 (OCH_3), 69.1 (OCH_2), 100.2 (C_c), 106.0 (C_5), 109.5 (C_3), 111.0 and 111.2 (C_e and C_b), 112.0 (C_f), 120.4 (C_8), 121.1 ($C_{4'}$), 123.4 (C_a), 124.4 (C_{10}), 124.7 (C_7), 127.5 (C_h), 129.8 ($C_{2'}$), 131.4 ($C_{3'}$ and C_g), 135.9 ($C_{1'}$), 149.9 (C_9), 153.0 (C_d), 155.6 and 155.8 (C_2

PARTIE EXPÉRIMENTALE

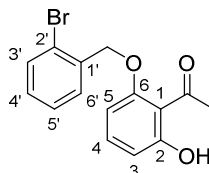
and C_6), 158.9 (CO), 176.9 (C_4). **MS** (ESI) m/z 545 (^{79}Br), 547 (^{81}Br) $[M-H]^-$. **Anal.** Calcd for $C_{28}H_{23}BrN_2O_5$: C, 61.44; H, 4.24; N, 5.12. Found: C, 60.91; H, 4.22; N, 4.89.



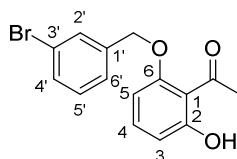
7-(4'-Bromobenzyloxy)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid [2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)-ethyl]-amide (7b). The crude was prepared according to general procedure D₁ starting from **6b** (450 mg, 1.2 mmol) and was washed with diethyl ether to afford **7b** as a white solid (295 mg, 45%). $C_{28}H_{23}BrN_2O_5$. **m.p.** 227–229°C. **1H NMR** (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.95 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz, NCH_2CH_2), 3.58 (q, 2H, $J = 6.8$ Hz, NCH_2CH_2), 3.74 (s, 3H, OCH_3), 5.27 (s, 2H, OCH_2), 6.71 (dd, 1H, $J = 2.0$ Hz, $J = 8.4$ Hz, H_e), 6.77 (s, 1H, H_3), 7.07 (d, 1H, $J = 1.8$ Hz, H_c), 7.16–7.24 (m, 4H, H_6 , H_8 , H_a , H_f), 7.45 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, $H_{2'}$), 7.63 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, $H_{3'}$), 7.97 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz, H_5), 9.17 (t, 1H, $J = 5.2$ Hz, $CONH$), 10.68 (s, 1H, indole NH). **^{13}C NMR** (100 MHz, DMSO- d_6) δ 24.9 ($NHCH_2CH_2$), under DMSO peak ($NHCH_2CH_2$), 55.3 (OCH_3), 69.2 (OCH_2), 100.1 (C_c), 101.9 (C_8), 110.5 (C_3), 111.1 and 111.2 (C_b and C_e), 112.1 (C_f), 115.7 (C_6), 117.8 (C_{10}), 121.3 ($C_{4'}$), 123.4 (C_a), 126.5 (C_5), 127.5 (C_h), 129.9 ($C_{2'}$), 131.4 (C_g), 131.5 ($C_{3'}$), 135.4 ($C_{1'}$), 153.0 (C_d), 155.5 (C_2), 156.8 (C_7), 158.9 (C_9), 163.1 (CO), 176.4 (C_4). **MS** (ESI) m/z observed for $C_{27}H_{20}BrN_2O_5$, 532 (^{79}Br), 534 (^{81}Br) $[M+H]^+$. **Anal.** Calcd for $C_{28}H_{23}BrN_2O_5$: C, 61.44; H, 4.24; N, 5.12. Found: C, 61.68; H, 4.13; N, 5.26.

II.1.3.3 Modulation of nature and position of groups on the benzyloxy cycle – Synthesis of compounds 11a to 11f and 16

○ Synthesis of compounds 11a to 11f

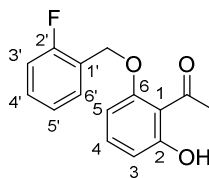


6-(2'-Bromobenzyloxy)-2-hydroxyacetophenone (8a). The crude was prepared according to general procedure A starting from 2,6-dihydroxyacetophenone (2 g, 13 mmol) and 2-bromobenzyloxybromide (4 g, 16 mmol) and was purified by flash silica column chromatography, using cyclohexane/ethyl acetate (100:0 to 98:2) as eluent to afford **8a** as a yellow solid (1.5 g, 36%). $C_{15}H_{13}BrO_3$. **m.p.** 68-70°C. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.45 (s, 3H, $COCH_3$), 5.17 (s, 2H, OCH_2), 6.54 (dd, 1H, $J = 0.7$ Hz, $J = 8.3$ Hz, H_3 or H_5), 6.64 (dd, 1H, $J = 0.7$ Hz, $J = 8.4$ Hz, H_3 or H_5), 7.32 (m, 2H, H_4 , $H_{4'}$), 7.44 (td, 1H, $J = 1.2$ Hz, $J = 7.5$ Hz, $H_{6'}$), 7.59 (dd, 1H, $J = 1.7$ Hz, $J = 7.6$ Hz, $H_{5'}$), 7.69 (dd, 1H, $J = 1.1$ Hz, $J = 7.9$ Hz, $H_{3'}$), 11.67 (s, 1H, OH). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 32.8 ($COCH_3$), 69.9 (OCH_2), 103.1 and 109.7 (C_3 and C_5), 114.6 (C_1), 122.9 ($C_{2'}$), 127.9 ($C_{5'}$), 130.3 and 130.5 ($C_{3'}$ and $C_{4'}$), 132.6 ($C_{6'}$), 133.8 (C_4), 135.2 ($C_{1'}$), 157.8 and 159.5 (C_2 and C_6), 203.3 (CO). **MS** (ESI) m/z 321 (^{79}Br), 323 (^{81}Br) $[M+H]^+$, 319 (^{79}Br), 321 (^{81}Br) $[M-H]^-$.

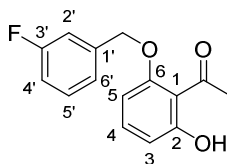


6-(3'-Bromobenzyloxy)-2-hydroxyacetophenone (8b). The crude was prepared according to general procedure A starting from 2,6-dihydroxyacetophenone (2 g, 13 mmol) and 3-bromobenzyloxybromide (4 g, 16 mmol) and was washed with diethyl ether to afford **8b** as a beige solid (3 g, 73%). $C_{15}H_{13}BrO_3$. **m.p.** 131-133°C. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.49 (s, 3H, $COCH_3$), 5.17 (s, 2H, OCH_2), 6.52 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, H_3 or H_5), 6.61 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, H_3 or H_5), 7.29 (t, 1H, $J = 8.3$ Hz, H_4), 7.37 (t, 1H, $J = 7.8$ Hz, $H_{5'}$), 7.46-7.55 (m, 2H, $H_{4'}$ and $H_{6'}$), 7.68 (s, 1H, $H_{2'}$), 13.58 (s, 1H, OH). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 33.0

(COCH₃), 69.1 (OCH₂), 103.5 and 109.7 (*C*₃ and *C*₅), 115.0 (*C*₁), 121.7 (*C*_{3'}), 126.7 (*C*_{6'}), 130.4 (*C*_{2'}), 130.7 and 130.8 (*C*_{5'} and *C*_{4'}), 133.7 (*C*₄), 139.4 (*C*_{1'}), 157.8 (*C*₆), 159.3 (*C*₂), 203.4 (CO). **MS** (ESI) *m/z* 319 (⁷⁹Br), 321 (⁸¹Br) [M-H]⁻.

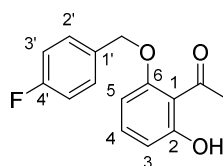


6-(2'-Fluorobenzyloxy)-2-hydroxyacetophenone (8c). The crude was prepared according to general procedure A starting from 2,6-dihydroxyacetophenone (2 g, 13 mmol) and 2-fluorobenzyllbromide (3 g, 16 mmol) and was washed with diethyl ether to afford **8c** as a white solid (1,3 g, 39%). C₁₅H₁₃FO₃. **m.p.** 106-108°C. **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.43 (s, 3H, COCH₃), 5.20 (s, 2H, OCH₂), 6.52 (dd, 1H, *J* = 0.8 Hz, *J* = 8.3 Hz, *H*₃ or *H*₅), 6.69 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, *H*₃ or *H*₅), 7.23-7.29 (m, 2H, *H*_{3'}, *H*_{6'}), 7.32 (t, 1H, *J* = 8.3 Hz, *H*₄), 7.41-7.45 (m, 1H, *H*_{5'}), 7.55-7.59 (m, 1H, *H*_{4'}). **¹³C NMR** (100 MHz, DMSO-d₆) δ 32.8 (COCH₃), 64.5 (OCH₂), 103.3 and 109.8 (*C*₁ and *C*₃), 114.7 (*C*₁), 115.4 and 115.6 (*C*_{3'} or *C*_{6'}), 123.2 and 123.3 (*C*_{2'}), 124.6 and 124.7 (*C*_{3'} or *C*_{6'}), 130.6, 130.7, 130.8 and 130.9 (*C*_{1'}, *C*_{4'} and *C*_{5'}), 133.9 (*C*₄), 158.0 (*C*₂), 159.12, 159.6 (*C*₆), 161.7, 203.4 (CO). **MS** (ESI) *m/z* 283 [M+Na]⁺, 259 [M-H]⁻.

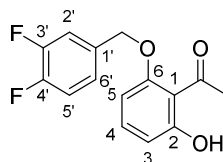


6-(3'-Fluorobenzyloxy)-2-hydroxyacetophenone (8d). The crude was prepared according to general procedure A starting from 2,6-dihydroxyacetophenone (2 g, 13 mmol) and 3-fluorobenzyllbromide (2.8 g, 15 mmol) and recrystallized with cyclohexane/ethyl acetate (9:1) to afford **8d** as a white solid (1.7 g, 50%). C₁₅H₁₃FO₃. **m.p.** 123-124°C. **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-d₆) δ under peak of DMSO (s, 3H, COCH₃), 5.18 (s, 2H, OCH₂), 6.52 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, *H*₃ or *H*₅), 6.62 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, *H*₃ or *H*₅), 7.14-7.20 (m, 1H, *H*_{4'}), 7.27-7.31 (m, 3H, *H*₄, *H*_{2'}, *H*_{6'}), 7.42-7.48 (m, 2H, *H*_{5'}). **¹³C NMR** (100 MHz, DMSO-d₆) δ 33.0 (COCH₃), 69.3 (OCH₂), 103.4 and 109.7 (*C*₃ and *C*₅), 114.3 and 114.5 and 114.6 and 114.8 and 114.9 (*C*₁ ,

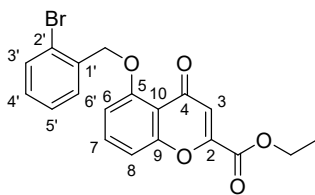
$C_{2'}$, $C_{4'}$), 123.6 and 123.7 ($C_{6'}$), 130.5 and 130.6 ($C_{5'}$), 133.7 (C_4), 139.4 and 139.5 ($C_{1'}$), 157.8 and 159.4 (C_2 and C_6), 160.9 and 163.4 ($C_{3'}$), 203.4 (CO). **MS** (ESI) m/z 259 [$M-H$] $^-$.



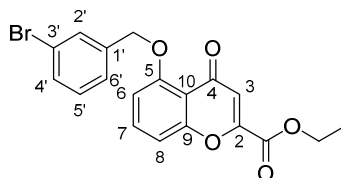
6-(4'-Fluorobenzoyloxy)-2-hydroxyacetophenone (8e). The crude was prepared according to general procedure A starting from 2,6-dihydroxyacetophenone (2 g, 13 mmol) and 4-fluorobenzylbromide (3 g, 16 mmol) and was washed with diethyl ether to afford **8e** as a beige solid (1.7 g, 50%). $C_{15}H_{13}FO_3$. **m.p.** 137-139°C. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.47 (s, 3H, $COCH_3$), 5.14 (s, 2H, OCH_2), 6.51 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, H_3 or H_5), 6.65 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, H_3 or H_5), 7.22 (m, 2H, $H_{3'}$), 7.31 (t, 1H, $J = 8.4$ Hz, H_4), 7.51 (m, 2H, $H_{2'}$). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 33.1 ($COCH_3$), 69.4 (OCH_2), 103.4 and 109.6 (C_3 and C_5), 114.7 (C_1), 115.2 and 115.4 ($C_{3'}$), 130.1 and 130.2 ($C_{2'}$), 132.8 ($C_{1'}$), 133.9 (C_4), 158.2 (C_6), 159.7 (C_2), 160.6 and 163.1 ($C_{4'}$), 203.5 (CO). **MS** (ESI) m/z 259 [$M-H$] $^-$.



6-(3',4'-Difluorobenzoyloxy)-2-hydroxyacetophenone (8f). The crude was prepared according to general procedure A starting from 2,6-dihydroxyacetophenone (5 g, 33 mmol) and 3,4-difluorobenzylbromide (8.2 g, 40 mmol) and was washed with diethyl ether to afford **PEB2-13** as a white solid (2.5 g, 27%). $C_{15}H_{12}F_2O_3$. **m.p.** 127-128°C. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.48 (s, 3H, $COCH_3$), 5.14 (s, 2H, OCH_2), 6.52 (dd, 1H, $J = 0.8$ Hz, $J = 8.3$ Hz, H_3 or H_5), 6.62 (dd, 1H, $J = 0.6$ Hz, $J = 8.3$ Hz, H_3 or H_5), 7.30 (t, 1H, $J = 8.3$ Hz, H_4), 7.34 (m, 1H, $H_{2'}$), 7.50 (m, 1H, $H_{6'}$), 7.56 (m, 1H, $H_{5'}$). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 33.0 ($COCH_3$), 68.8 (OCH_2), 103.4 and 109.7 (C_3 and C_5), 114.9 (C_1), 116.9 and 117.0 ($C_{6'}$), 117.5 and 117.7 ($C_{5'}$), 124.7, 124.7, 124.8 and 124.8 ($C_{2'}$), 133.7 (C_4), 134.3, 134.3, 134.3, and 134.4 ($C_{1'}$), 147.8 -148.2 ($C_{3'}$ or $C_{4'}$), 150.2, 150.4, 150.5 and 150.6 ($C_{3'}$ or $C_{4'}$), 157.8 and 159.5 (C_2 and C_6), 203.4 ($COCH_3$). **MS** (ESI) m/z 277 [$M-H$] $^-$.

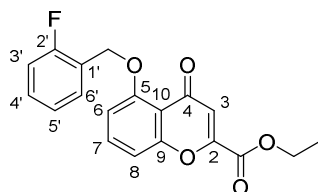


5-(2'-Bromobenzyloxy)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid ethyl ester (9a). The crude was prepared according to general procedure B starting from **8a** (273 mg, 0.8 mmol) and was purified by flash silica column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (9:1 to 8:2) as eluent to afford **9a** as a beige solid (150 mg, 44%). $C_{19}H_{15}BrO_5$. **m.p.** 155 -157°C. 1H **NMR** (400 MHz, DMSO- d_6) δ 1.35 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz, $COCH_2CH_3$), 4.39 (q, 2H, $J = 7.1$ Hz, $COCH_2CH_3$), 5.23 (s, 2H, OCH_2), 6.80 (s, 1H, H_3), 7.15 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H_6 or H_8), 7.28 (dd, 1H, $J = 0.7$ Hz, $J = 8.5$ Hz, H_6 or H_8), 7.32 (td, 1H, $J = 1.7$ Hz, $J = 7.8$ Hz, H_4'), 7.50 (td, 1H, $J = 1.1$ Hz, $J = 7.5$ Hz, H_5'), 7.67 (dd, 1H, $J = 1.1$ Hz, $J = 7.1$ Hz, H_3'), 7.79 (t, 1H, $J = 8.4$ Hz, H_7), 8.10 (dd, 1H, $J = 1.5$ Hz, $J = 7.7$ Hz, H_6'). ^{13}C **NMR** (100 MHz, DMSO- d_6) δ 13.9 (OCH_2CH_3), 62.6 (OCH_2CH_3), 69.8 (OCH_2), 108.9 and 110.8 (C_6 and C_8), 114.7 (C_{10}), 115.5 (C_3), 121.1 ($C_{2'}$), 127.9 ($C_{5'}$), 129.2 ($C_{6'}$), 129.6 ($C_{4'}$), 132.2 ($C_{3'}$), 135.5 (C_7), 135.7 ($C_{1'}$), 150.3 (C_2), 157.3 and 157.5 (C_5 and C_9), 161.0 (CO), 176.5 (C_4). **MS** (ESI) m/z 403 (^{79}Br), 405 (^{81}Br) [$M+H$] $^+$.

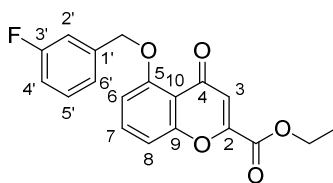


5-(3'-Bromobenzyloxy)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid ethyl ester (9b). The crude was prepared according to general procedure B starting from **8b** (3 g, 9.4 mmol) and washed with diethyl ether to afford **9b** as a yellow solid (2 g, 50%). $C_{19}H_{15}BrO_5$. **m.p.** 147-149°C. 1H **NMR** (400 MHz, DMSO- d_6) δ 1.75 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, OCH_2CH_3), 4.80 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, OCH_2CH_3), 5.69 (s, 2H, OCH_2), 7.22 (s, 1H, H_3), 7.12 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H_6 or H_8), 7.25 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H_6 or H_8), 7.38 (t, 1H, $J = 7.8$ Hz, H_5'), 7.54 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz, H_4'), 7.60 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz, H_6'), 7.77 (t, 1H, $J = 8.0$ Hz, H_7), 7.92 (s, 1H, s, $H_{2'}$). ^{13}C **NMR** (100 MHz, DMSO- d_6) δ 13.9 (OCH_2CH_3), 62.6 (OCH_2CH_3), 69.0 (OCH_2), 109.0 and 110.6 (C_6 and C_8), 114.7 (C_{10}), 115.5 (C_3), 121.7 ($C_{3'}$), 125.6 ($C_{6'}$), 129.4 ($C_{2'}$), 130.3 and 130.5 ($C_{4'}$ and $C_{5'}$),

135.3 (C_7), 139.6 ($C_{1'}$), 150.2 (C_2), 157.3 and 157.6 (C_5 and C_9), 160.0 (CO), 176.5 (C_4). **MS** (ESI) m/z 425 (^{79}Br), 427 (^{81}Br) [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$.

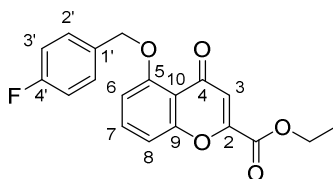


5-(2'-Fluorobenzyloxy)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid ethyl ester (9c). The crude was prepared according to general procedure B starting from **8c** (900 mg, 3.5 mmol) and was purified by flash silica column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (1:0 to 8:2) as eluent to afford **9c** as a white solid (265 mg, 24%). $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{FO}_5$. **m.p** 156-157°C. **^1H NMR** (400 MHz, DMSO-d_6) δ 1.34 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz, OCH_2CH_3), 4.38 (q, 2H, $J = 7.1$ Hz, OCH_2CH_3), 5.29 (s, 2H, OCH_2), 6.76 (s, 1H, H_3), 7.18-7.31 (m, 4H, H_6 , H_8 , $H_{3'}$, $H_{6'}$), 7.39-7.45 (m, 1H, $H_{5'}$), 7.76 (t, 1H, $J = 8.4$ Hz, H_7), 7.92 (dt, 1H, $J = 1.5$ Hz, $J = 7.5$ Hz, $H_{4'}$). **^{13}C NMR** (100 MHz, DMSO-d_6) δ 13.9 (OCH_2CH_3), 62.6 (OCH_2CH_3), 64.5 (OCH_2), 109.1 and 110.7 (C_6 and C_8), 114.7, 114.9, 115.1, 115.4 (C_3 , C_{10} and $C_{3'}$ or $C_{6'}$), 123.6 and 123.8 ($C_{2'}$), 124.5 ($C_{3'}$ or $C_{6'}$), 129.6, 129.7 and 129.9 ($C_{1'}$, $C_{4'}$ and $C_{5'}$), 136.4 (C_7), 150.2 (C_2), 157.3 and 157.7 (C_5 and C_9), 158.4, 160.0 (CO), 160.9, 176.4 (C_4). **MS** (ESI) m/z 343 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, 365 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$.

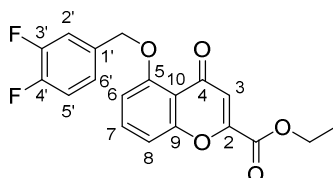


5-(3'-Fluorobenzyloxy)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid ethyl ester (9d). The crude was prepared according to general procedure B starting from **8d** (1.5 g, 5.7 mmol) to afford **9d** as white solid (1.7 g, 87%). $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{FO}_5$. **m.p.** 108-109°C. **^1H NMR** (400 MHz, DMSO-d_6) δ 1.34 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz, OCH_2CH_3), 4.38 (q, 2H, $J = 7.1$ Hz, OCH_2CH_3), 5.30 (s, 2H, OCH_2), 6.80 (s, 1H, H_3), 7.11-7.26 (m, 2H, H_6 or H_8 , $H_{4'}$), 7.26 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, H_6 or H_8), 7.41-7.47 (m, 2H, $H_{5'}$, $H_{6'}$), 7.56 (d, 1H, $J = 10.3$ Hz, $H_{2'}$), 7.76 (t, 1H, $J = 8.4$ Hz, H_7). **^{13}C NMR** (100 MHz, DMSO-d_6) δ 13.9 (COCH_2CH_3), 62.6 (COCH_2CH_3), 69.1 (OCH_2), 109.0 and 110.6 (C_6 and C_8), 113.3 and 113.5 ($C_{2'}$), 114.1 and 114.3 ($C_{4'}$), 114.7 (C_{10}), 115.4 (C_3),

122.4 ($C_{6'}$), 130.2 and 130.3 ($C_{5'}$), 135.3 (C_7), 139.7 and 139.8 ($C_{1'}$), 150.2 (C_2), 157.3 and 157.6 (C_5 and C_9), 160.0 (CO), 161.1 and 163.5 ($C_{3'}$), 176.5 (C_4). **MS** (ESI) m/z 343 [$M+H$] $^+$.

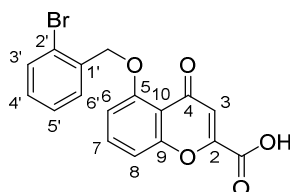


5-(4'-Fluorobenzoyloxy)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid ethyl ester (9e). The crude was prepared according to general procedure B starting from **8e** (1.2 g, 4.6 mmol) and was washed with diethyl ether to afford **9e** as a yellowish solid (590 mg, 39%). $C_{19}H_{15}FO_5$. **m.p.** 125-126°C. **1H NMR** (400 MHz, DMSO- d_6) δ 1.34 (t, 3H, J = 7.1 Hz, OCH_2CH_3), 4.38 (q, 2H, J = 7.2 Hz, OCH_2CH_3), 5.25 (s, 2H, OCH_2), 6.77 (s, 1H, H_3), 7.13 (d, 1H, J = 7.7 Hz, H_6 or H_8), 7.25 (m, 3H, H_6 or H_8 , $H_{3'}$), 7.66 (m, 1H, $H_{2'}$), 7.75 (t, 1H, J = 8.4 Hz, H_7). **^{13}C NMR** (100 MHz, DMSO- d_6) δ 13.9 (OCH_2CH_3), 62.6 (OCH_2CH_3), 69.4 (OCH_2), 109.1 and 110.5 (C_7 and C_8), 114.7 (C_{10}), 115.0, 115.2 and 115.5 (C_3 and $C_{3'}$), 128.9 and 129.0 ($C_{2'}$), 132.9 ($C_{1'}$), 135.3 (C_7), 150.2 (C_2), 157.3 and 157.8 (C_5 and C_9), 160.1 (CO), no signal for C_4 , 176.4 (C_4). **MS** (ESI) m/z 343 [$M+H$] $^+$, 365 [$M+Na$] $^+$.

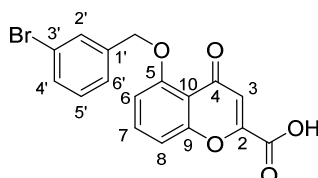


5-(3',4'-Difluorobenzoyloxy)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid ethyl ester (9f). The crude was prepared according to general procedure B starting from **8f** (900 mg, 3.2 mmol) and was purified by flash silica column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (100:0 to 50:50) as eluent to afford **9f** as a white solid (200 mg, 18%). $C_{19}H_{14}F_2O_5$. **m.p.** 145-146°C. **1H NMR** (400 MHz, DMSO- d_6) δ 1.34 (t, 3H, J = 7.1 Hz, OCH_2CH_3), 4.38 (q, 2H, J = 7.1 Hz, OCH_2CH_3), 5.26 (s, 2H, OCH_2), 6.80 (s, 1H, H_3), 7.12 (d, 1H, J = 8.0 Hz, H_6 or H_8), 7.25 (d, 1H, J = 7.9 Hz, H_6 or H_8), 7.46-7.50 (m, 2H, $H_{2'}$, $H_{5'}$), 7.75-7.80 (m, 2H, $H_{6'}$, H_7). **^{13}C NMR** (100 MHz, $CDCl_3$) δ 13.9 (OCH_2CH_3), 62.6 (OCH_2CH_3), 68.7 (OCH_2), 109.0 and 110.7 (C_6 and C_8), 114.7 (C_{10}), 115.5 (C_3), 115.7 and 115.9 ($C_{6'}$), 117.3 and 117.5 ($C_{5'}$),

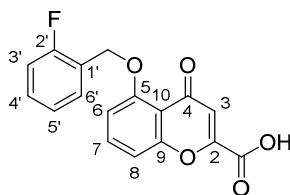
123.3 ($C_{2'}$), 134.6 ($C_{1'}$), 135.4 (C_7), 147.4 and 148.4 ($C_{3'}$ and $C_{4'}$), 150.3 (C_2), 157.2 and 157.5 (C_5 and C_9), 160.0 (CO), 176.5 (C_4). **MS** (ESI) m/z 361 [$M+H$] $^+$, 383 [$M+Na$] $^+$.



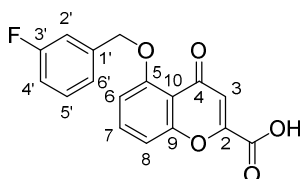
5-(2'-Bromobenzyloxy)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid (10a). The crude was prepared according to general procedure C starting from **9a** (150 mg, 0.4 mmol) to afford **10a** as a white solid (103 mg, 74%). $C_{17}H_{11}BrO_5$. **m.p.** 244-245°C. **1H NMR** (400 MHz, DMSO- d_6) δ 5.22 (s, 2H, OCH_2), 6.74 (s, 1H, H_3), 7.13 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, H_6 or H_8), 7.25 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, H_6 or H_8), 7.30 (td, 1H, $J = 1.6$ Hz, $J = 7.8$ Hz, $H_{4'}$), 7.49 (td, 1H, $J = 1.0$ Hz, $J = 7.6$ Hz, $H_{5'}$), 7.67 (dd, 1H, $J = 0.9$ Hz, $J = 7.9$ Hz, $H_{3'}$), 7.77 (t, 1H, $J = 8.4$ Hz, H_7), 8.11 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz, $H_{6'}$). **^{13}C NMR** (100 MHz, DMSO- d_6) δ 69.8 (OCH_2), 108.7 and 110.9 (C_6 and C_8), 114.7 (C_{10}), 115.0 (C_3), 121.1 ($C_{2'}$), 127.9 ($C_{5'}$), 129.2 ($C_{6'}$), 129.6 ($C_{4'}$), 132.2 ($C_{3'}$), 135.3 (C_7), 135.8 ($C_{1'}$), no signal for C_2 , 157.4 and 157.5 (C_5 and C_9), 161.4 (CO), 176.9 (C_4). **MS** (ESI) m/z 373 (^{79}Br), 375 (^{81}Br) [$M-H$] $^-$.



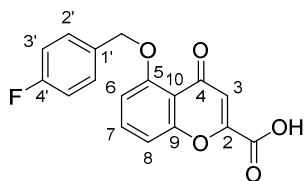
5-(3'-Bromobenzyloxy)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid (10b). The crude was prepared according to general procedure C starting from **9b** (1.8 mg, 4.5 mmol) to afford **10b** as a beige solid (821 mg, 49%). $C_{17}H_{11}BrO_5$. **m.p.** > 230°C (decomposed). **1H NMR** (400 MHz, DMSO- d_6) δ 5.26 (s, 2H, OCH_2), 6.74 (s, 1H, H_3), 7.07 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, H_6 or H_8), 7.20 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, H_6 or H_8), 7.37 (t, 1H, $J = 7.8$ Hz, $H_{5'}$), 7.51 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz, $H_{6'}$), 7.60 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz, $H_{4'}$), 7.72 (t, 1H, $J = 8.4$ Hz, H_7), 7.92 (s, 1H, $H_{2'}$). **^{13}C NMR** (100 MHz, DMSO- d_6) δ 69.0 (OCH_2), 108.6 and 110.7 (C_6 and C_8), 114.4 and 114.7 (C_3 and C_{10}), 121.7 ($C_{3'}$), 125.6 ($C_{6'}$), 129.4 ($C_{2'}$), 130.3 and 130.5 ($C_{4'}$ and $C_{5'}$), 134.9 (C_7), 139.7 ($C_{1'}$), no signal for C_2 , 157.5 and 157.6 (C_5 and C_9), 161.5 (COOH), 177.2 (C_4). **MS** (ESI) m/z 373 (^{79}Br), 375 (^{81}Br) [$M-H$] $^-$, 397 (^{79}Br), 399 (^{81}Br) [$M+Na$] $^+$.



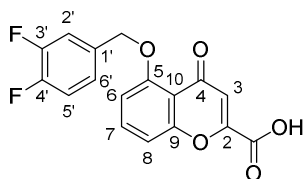
5-(2'-Fluorobenzyloxy)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid (10c). The crude was prepared according to general procedure C starting from **9c** (265 mg, 0.8 mmol) and was washed with diethyl ether to afford **10c** as a white solid (157 mg, 65%). $C_{17}H_{11}FO_5$. **m.p.** 213-214°C. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 5.29 (s, 2H, OCH_2), 6.73 (s, 1H, H_3), 7.16-7.31 (m, 4H, H_6 , H_8 , $H_{3'}$, $H_{6'}$), 7.38-7.42 (m, 1H, $H_{5'}$), 7.75 (t, 1H, J = 8.4 Hz, H_7), 7.93 (td, J = 1.6 Hz, J = 7.6 Hz, $H_{4'}$). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 64.5 (OCH_2), 108.9 and 110.8 (C_6 and C_8), 114.7, 115.0 and 115.2 (C_3 , C_{10} , $C_{3'}$ or $C_{6'}$), 123.7 and 123.8 ($C_{2'}$), 124.5 and 124.6 ($C_{3'}$ or $C_{6'}$), 129.7, 129.8 and 129.9 ($C_{1'}$, $C_{4'}$ and $C_{5'}$), 135.3 (C_7), 151.4 (C_2), 157.4 and 157.7 (C_5 and C_9), 161.5 (CO), 176.8 (C_4). **MS** (ESI) m/z 313 $[M-H]^-$, 315 $[M+H]^+$, 337 $[M+Na]^+$.



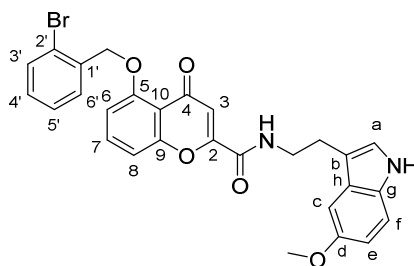
5-(3'-Fluorobenzyloxy)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid (10d). The crude was prepared according to general procedure C starting from **9d** (1.2 g, 3.5 mmol) to afford **10d** as a white solid (840 mg, 76%). $C_{17}H_{11}FO_5$. **m.p.** 241-242°C. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 5.29 (s, 2H, OCH_2), 6.76 (s, 1H, H_3), 7.10-7.16 (m, 2H, H_6 or H_8 , $H_{4'}$), 7.22 (d, 1H, J = 8.5 Hz, H_6 or H_8), 7.41-7.48 (m, 2H, $H_{5'}$, $H_{6'}$), 7.56 (d, 1H, J = 10.2 Hz, $H_{2'}$), 7.77 (t, 1H, J = 8.4 Hz, H_7). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 69.1 (OCH_2), 108.8 and 110.6 (C_6 and C_8), 113.3 and 113.5 ($C_{2'}$), 114.0 and 114.2 ($C_{4'}$), 114.7 (C_{10}), 115.2 (C_3), 122.4 ($C_{6'}$), 130.2 and 130.3 ($C_{5'}$), 135.2 (C_7), 139.8 and 139.9 ($C_{1'}$), 151.2 (C_2), 157.4 and 157.6 (C_5 and C_9), 161.5 (COOH), 163.5 ($C_{3'}$), 176.8 (C_4). **MS** (ESI) m/z 313 $[M-H]^-$, 315 $[M+H]^+$, 337 $[M+Na]^+$.



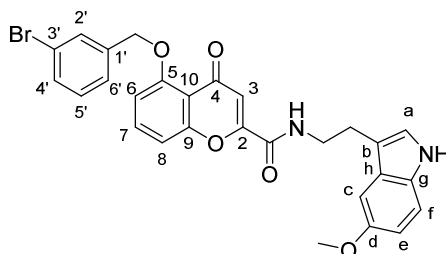
5-(4'-Fluorobenzyloxy)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid (10e). The crude was prepared according to general procedure C starting from **9e** (500 mg, 1.5 mmol) and was washed with diethyl ether to afford **10e** as a yellowish solid (220 mg, 47%). **m.p.** 178-179°C. $C_{17}H_{11}FO_5$. **1H NMR** (400 MHz, DMSO- d_6) δ 5.24 (s, 2H, OCH_2), 6.69 (s, 1H, H_3), 7.10 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, H_6 or H_8), 7.20 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, H_6 or H_8), 7.22-7.26 (m, 2H, $H_{3'}$), 7.65-7.69 (m, 2H, $H_{2'}$), 7.72 (t, 1H, $J = 8.4$ Hz, H_7). **^{13}C NMR** (100 MHz, DMSO- d_6) δ 69.3 (OCH_2), 108.8 (C_6 or C_8), 110.6 (C_6 or C_8), 114.7 (C_{10}), 115.0 (C_3), 115.2 ($C_{3'}$), 128.9 and 130.0 ($C_{2'}$ and $C_{4'}$), 133.0 and 133.1 ($C_{1'}$), 134.9 (C_7), no signal for C_2 , 157.5 and 157.8 (C_5 and C_9), 161.4 (COOH), 166.9 (C_4). **MS** (ESI) m/z 313 $[M-H]^-$.



5-(3', 4'-Difluorobenzyloxy)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid (10f). The crude was prepared according to general procedure C starting from **9f** (196 mg, 0.5 mmol) to afford **10f** as a white solid (142 mg, 79%). $C_{17}H_{10}F_2O_5$. **m.p.** 198-199°C. **1H NMR** (400 MHz, DMSO- d_6) δ 5.25 (s, 2H, OCH_2), 6.74 (s, 1H, H_3), 7.10 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz, H_6 or H_8), 7.23 (d, 1H, $J = 7.7$ Hz, H_6 or H_8), 7.46-7.48 (m, 2H, $H_{2'}$, $H_{5'}$), 7.73-7.81 (m, 2H, $H_{6'}$, H_7). **^{13}C NMR** (500 MHz, DMSO- d_6) δ 68.6 (OCH_2), 108.8 and 110.7 (C_6 and C_8), 114.7 (C_{10}), 115.1 (C_3), 115.7 and 115.8 ($C_{6'}$), 117.3 and 117.5 ($C_{5'}$), 123.2, 123.3, 123.3 and 123.3 ($C_{2'}$), 134.7, 134.7, 134.7 and 134.8 ($C_{1'}$), 135.2 (C_7), 147.7, 147.8, 148.4 and 148.5 ($C_{3'}$), 149.6, 149.7, 150.3 and 150.4 ($C_{4'}$), 151.5 (C_2), 157.4 and 157.5 (C_5 and C_9), 161.5 (COOH), 176.9 (C_4). **MS** (ESI) m/z 331 $[M-H]^-$.

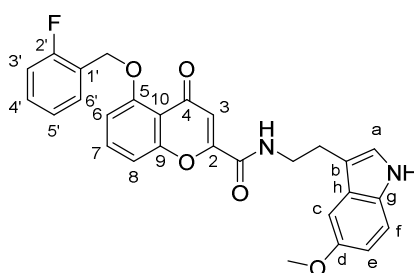


5-(2'-Bromobenzyloxy)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid [2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)-ethyl]-amide (11a). The crude was prepared according to general procedure D₁ starting from **10a** (103 mg, 0.3 mmol) and 5-methoxytryptamine hydrochloride (105 mg, 0.55 mmol) and was purified by flash silica column chromatography, using dichloromethane/methanol (95:5) as eluent to afford **11a** as a white solid (36 mg, 24%). C₂₈H₂₃BrN₂O₅. **m.p.** 204-205°C. **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.95 (t, 2H, *J* = 7.6 Hz, NHCH₂CH₂), 3.56 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, NHCH₂CH₂), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 5.23 (s, 2H, OCH₂), 6.69 (s, 1H, *H*₃), 6.71 (dd, 1H, *J* = 2.4 Hz, *J* = 8.8 Hz, *H*_e), 7.08 (d, 1H, *J* = 2.3 Hz, *H*_e), 7.15 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, *H*₆ or *H*₈), 7.17 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz, *H*_a), 7.23 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz, *H*_f), 7.28-7.34 (m, 2H, *H*₆ or *H*₈, *H*_{4'}), 7.50 (td, 1H, *J* = 1.1 Hz, *J* = 7.6 Hz, *H*_{5'}), 7.67 (dd, 1H, *J* = 1.1 Hz, *J* = 8.0 Hz, *H*_{3'}), 7.80 (t, 1H, *J* = 8.4 Hz, *H*₇), 8.12 (dd, 1H, *J* = 1.5 Hz, *J* = 7.7 Hz, *H*_{6'}), 9.20 (t, 1H, *J* = 5.7 Hz, CONH), 10.7 (s, 1H, indole NH). **¹³C NMR** (500 MHz, DMSO-d₆) δ 24.9 (NHCH₂CH₂), under peak of DMSO (NHCH₂CH₂), 55.4 (OCH₃), 70.0 (OCH₂), 100.1 (*C*_c), 108.8 and 110.5 (*C*₆ and *C*₈), 111.1 and 111.2 (*C*_e and *C*_b), 112.0 and 112.1 (*C*₃ and *C*_f), 114.5 (*C*₁₀), 121.1 (*C*_{2'}), 123.5 (*C*_a), 127.6 (*C*_h), 127.9 (*C*_{5'}), 129.2 (*C*_{6'}), 129.6 (*C*_{4'}), 131.4 (*C*_g), 132.2 (*C*_{3'}), 135.2 (*C*₇), 135.8 (*C*_{1'}), 153.0 (*C*_d), 153.7 (*C*₂), 157.1 and 157.5 (*C*₅ and *C*₉), 158.9 (CO), 176.6 (*C*₄). **MS** (ESI) *m/z* 547 (⁷⁹Br), 549 (⁸¹Br) [M+H]⁺, 545 (⁷⁹Br), 547 (⁸¹Br) [M-H]⁻. **Anal.** Calcd for C₂₈H₂₃BrN₂O₅, C, 61.43; H, 4.24; N, 5.12; Found: C, 61.74; H, 4.22; N, 5.12.



5-(3'-Bromobenzyloxy)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid [2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)-ethyl]-amide (11b). The crude was prepared according to general procedure D₁ starting

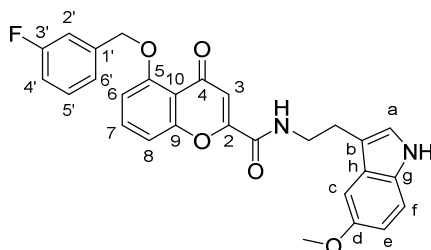
from **10b** (0.6 g, 1.7 mmol) and 5-methoxytryptamine hydrochloride (323 mg, 1.7 mmol) and was recrystallized in ethyl acetate/toluene (9:1) to afford **11b** as a cream solid (456 mg, 49%). $C_{28}H_{23}BrN_2O_5$. **m.p.** 199-200°C. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.95 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz, $NH_2CH_2CH_2$), 3.57 (q, 2H, $J = 6.8$ Hz, $NHCH_2CH_2$), 3.74 (s, 3H, OCH_3), 5.27 (s, 2H, OCH_2), 6.69 (s, 1H, H_3), 6.70-6.73 (dd, 1H, $J = 2.4$ Hz, $J = 8.7$ Hz, H_e), 7.08 (d, 1H, $J = 1.8$ Hz, H_c), 7.10 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, H_6 or H_8), 7.17 (d, 1H, $J = 1.7$ Hz, H_a), 7.23 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz, H_f), 7.26 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, H_6 or H_8), 7.38 (t, 1H, $J = 7.8$ Hz, $H_{5'}$), 7.52 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, $H_{4'}$), 7.60 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz, $H_{6'}$), 7.77 (t, 1H, $J = 8.4$ Hz, H_7), 7.91 (s, 1H, $H_{2'}$), 9.19 (t, 1H, $J = 5.2$ Hz, CONH), 10.68 (s, 1H, indole NH). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 24.9 ($NHCH_2CH_2$), under peak of DMSO ($NHCH_2CH_2$), 55.2 (OCH_3), 69.0 (OCH_2), 100.2 (C_c), 108.9 and 110.7 (C_6 and C_8), 111.1 and 111.2 (C_e and C_b), 112.0 and 112.1 (C_3 and C_f), 114.5 (C_{10}), 121.7 ($C_{3'}$), 123.4 (C_a), 125.6 ($C_{6'}$), 127.5 (C_h), 129.4 ($C_{2'}$), 130.3 ($C_{4'}$), 130.5 ($C_{5'}$), 131.4 (C_g), 135.0 (C_7), 139.7 ($C_{1'}$), 153.0 (C_d), 153.6 (C_2), 157.0 (C_9), 157.6 (C_5), 158.9 (CO), 176.6 (C_4). MS (ESI) m/z 569 (^{79}Br), 571 (^{81}Br) $[M+Na]^+$; Anal. Calcd for $C_{28}H_{23}BrN_2O_5$, C, 61.43; H, 4.24; N, 5.12; Found: C, 59.73; H, 4.29; N, 4.82.



5-(2'-Fluorobenzyloxy)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid [2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)-ethyl]-amide (11c). The crude was prepared according to general procedure D₂ starting from **10c** (157 mg, 0.5 mmol) and was recrystallized in acetonitrile to afford **11c** as a white solid (18 mg, 7%). $C_{28}H_{23}FN_2O_5$. **m.p.** 216-217°C. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.95 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz, $NHCH_2CH_2$), 3.56 (q, 2H, $J = 6.7$ Hz, $NHCH_2CH_2$), 3.73 (s, 3H, OCH_3), 5.29 (s, 2H, OCH_2), 6.66 (s, 1H, H_3), 6.71 (m, 1H, H_e), 7.07 (m, 1H, H_c), 7.17-7.29 (m, 6H, H_6 , H_8 , H_a , H_f , $H_{3'}$, $H_{6'}$), 7.41 (m, 1H, $H_{5'}$), 7.78 (t, 1H, $J = 8.4$ Hz, H_7), 7.95 (t, 1H, $J = 7.5$ Hz, $H_{4'}$), 9.21 (t, 1H, $J = 5.5$ Hz, CONH), 10.69 (s, 1H, indole NH). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 24.9 ($NHCH_2CH_2$), under peak of DMSO ($NHCH_2CH_2$), 55.3 (OCH_3), 64.5 (OCH_2), 100.1 (C_c), 108.9 and 110.8 (C_6 and C_8), 111.1 and 111.2 (C_e and C_b), 112.1 (C_3 and C_f), 114.5, 115.0 and 115.2 ($C_{3'}$ and C_{10}), 123.4 (C_a), 123.7 and 123.9 ($C_{2'}$), 124.5 ($C_{6'}$), 127.6 (C_h),

PARTIE EXPÉRIMENTALE

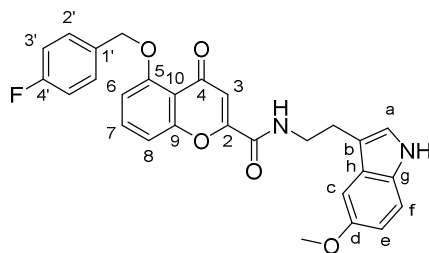
129.6 and 129.7 and 129.8 and 129.9 ($C_{1'}$, $C_{4'}$ and $C_{5'}$), 131.4 (C_g), 135.0 (C_7), 153.0 (C_d), 153.6 (C_2), 157.0 (C_9), 157.7 (C_5), 158.4, 158.9 (CO), 160.8, 176.5 (C_4). **MS** (ESI) m/z 485 $[M-H]^-$, 487 $[M+H]^+$, 509 $[M+Na]^+$. **Anal.** Calcd for $C_{28}H_{23}FN_2O_5$, C, 69.13; H, 4.77; N, 5.76; Found: C, 69.09; H, 4.81; N, 6.13.



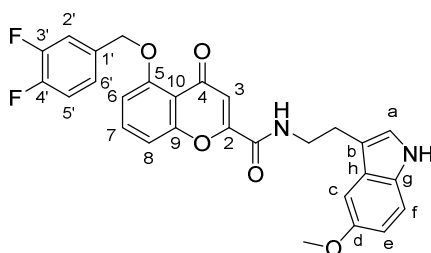
5-(3'-Fluorobenzyloxy)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid [2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)-ethyl]-amide (11d). The crude was prepared according to general procedure D₁ starting from **10d** (370 mg, 1.2 mmol) and was washed with diethyl ether to afford **11d** as a white solid (300 mg, 51%). $C_{28}H_{23}FN_2O_5$. **m.p.** > 260°C decomposition. **¹H NMR** (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.95 (t, 2H, J = 7.6 Hz, $NHCH_2CH_2$), 3.57 (q, 2H, J = 7.4 Hz, $NHCH_2CH_2$), 3.75 (s, 3H, OCH_3), 5.29 (s, 2H, OCH_2), 6.69 (s, 1H, H_3), 6.71 (dd, 1H, J = 2.4 Hz, J = 8.7 Hz, H_e), 7.08 (d, 1H, J = 2.3 Hz, H_c), 7.11 (d, 1H, J = 8.3 Hz, H_6 or H_8), 7.15 (m, 1H, $H_{4'}$), 7.17 (d, 1H, J = 2.2 Hz, H_a), 7.23 (d, 1H, J = 8.8 Hz, H_f), 7.26 (d, 1H, J = 8.0 Hz, H_6 or H_8), 7.41-7.49 (m, 2H, $H_{5'}$, $H_{6'}$), 7.57 (m, 1H, $H_{2'}$), 7.77 (t, 1H, J = 8.4 Hz, H_7), 9.19 (t, 1H, J = 5.8 Hz, CONH), 10.68 (s, 1H, indole NH). **¹³C NMR** (100 MHz, DMSO- d_6) δ 24.9 ($NHCH_2CH_2$), under peak of DMSO ($NHCH_2CH_2$), 55.3 (OCH_3), 69.1 (OCH_2), 100.1 (C_c), 108.9 and 110.6 (C_6 and C_8), 111.1 (C_e), 111.2 (C_b), 112.0 and 112.1 (C_3 and C_f), 113.3 and 113.5 ($C_{2'}$), 114.0 and 114.3 ($C_{4'}$), 114.5 (C_{10}), 122.4 ($C_{6'}$), 123.4 (C_a), 127.5 (C_h), 130.2 and 130.3 ($C_{5'}$), 131.4 (C_g), 135.0 (C_7), 139.8 ($C_{1'}$), 153.0 (C_2), 153.6 (C_d), 157.0 and 157.6 (C_5 and C_9), 158.9 (CO), 161.1 and 161.5 ($C_{3'}$), 176.6 (C_4). **MS** (ESI) m/z 485 $[M-H]^-$, 521 $[M+Cl]^-$. **Anal.** Calcd for $C_{28}H_{23}FN_2O_5$, C, 69.13; H, 4.77; N, 5.76;

Found: C, 36.68; H, 4.62; N, 3.27.

Note : in this case we expect that an error occurred during the experiment (apparatus or wrong sample)



5-(4'-Fluorobenzyloxy)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid [2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)-ethyl]-amide (11e). The crude was prepared according to general procedure D₃ starting from **10e** (180 mg, 0.6 mmol) and 5-methoxytryptamine hydrochloride (114 mg, 0.6 mmol) and was precipitated with diethyl ether to afford **11e** as a yellow solid (118 mg, 50%). C₂₈H₂₃FN₂O₅. **m.p.** 234-236°C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.95 (t, 2H, *J* = 7.8 Hz, NH₂CH₂CH₂), 3.56 (q, 2H, *J* = 6.7 Hz, NHCH₂CH₂), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 5.24 (s, 2H, OCH₂), 6.67 (s, 1H, *H*₃), 6.72 (dd, 1H, *J* = 2.4 Hz, *J* = 8.7 Hz, *H*_e), 7.07 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz, *H*_c), 7.12 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, *H*₆ or *H*₈), 7.17 (d, 1H, *J* = 2.3 Hz, *H*_a), 7.22-7.27 (m, 4H, *H*_{3'}, *H*₆ or *H*₈, *H*_f), 7.67 (m, 2H, *H*_{2'}), 7.76 (t, 1H, *J* = 8.4 Hz, *H*₇), 9.18 (t, 1H, *J* = 5.8 Hz, CONH), 10.7 (s, 1H, indole NH). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 24.8 (NHCH₂CH₂), under peak of DMSO (NHCH₂CH₂), 55.3 (OCH₃), 69.3 (OCH₂), 100.1 (*C*_c), 109.0 and 110.5 (*C*₆ and *C*₈), 111.1 and 111.2 (*C*_b and *C*_f), 112.1 (*C*_e), 114.5 (*C*₁₀), 115.0 and 115.2 (*C*₃ and *C*_{3'}), 123.4 (*C*_a), 127.5 (*C*_h), 128.9 and 129.0 (*C*_{2'} and *C*_{4'}), 131.4 (*C*_g), 133.0 (*C*_{1'}), 134.9 (*C*₇), 153.0 and 153.6 (*C*₂ and *C*_d), 157.0 and 157.8 (*C*₅ and *C*₉) 158.9 (CO), 176.5 (*C*₄). **MS** (ESI) *m/z* 487 [M+H]⁺, 509 [M+Na]⁺. **Anal.** Calcd for C₂₈H₂₃FN₂O₅, C, 69.13; H, 4.77; N, 5.76; Found: C, 68.63; H, 4.63; N, 5.66.

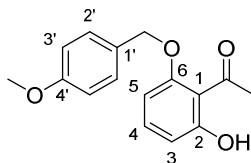


5-(3', 4'-Difluorobenzyloxy)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid [2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)-ethyl]-amide (11f). The crude was prepared according to general procedure D₂ starting from **10f** (142 mg, 0.4 mmol) and was recrystallized in acetonitrile to afford **11f** as a white solid (13.5 mg, 5%). C₂₈H₂₂F₂N₂O₅. **m.p.** 234-236°C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.95 (t, 2H, *J* = 7.7 Hz, NHCH₂CH₂), 3.57 (q, 2H, *J* = 6.7 Hz, NHCH₂CH₂), 3.74 (s, 3H,

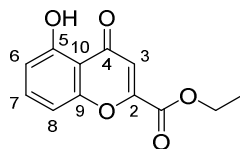
PARTIE EXPÉRIMENTALE

OCH₃), 5.25 (s, 2H, OCH₂), 6.69 (s, 1H, *H*₃), 6.71 (dd, 1H, *J* = 2.4 Hz, *J* = 8.7 Hz, *H*_e), 7.08 (d, 1H, *J* = 2.3 Hz, *H*_c), 7.10 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, *H*₆ or *H*₈), 7.17 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz, *H*_a), 7.23-7.27 (m, 2H, *H*₆ or *H*₈ and *H*_f), 7.46-7.50 (m, 2H, *H*₂, *H*₅), 7.75-7.81 (m, 2H, *H*₇, *H*₆), 9.19 (t, 1H, *J* = 5.8 Hz, CONH), 10.7 (s, 1H, indole NH). **¹³C NMR** (100 MHz, DMSO-d₆) δ 24.9 (NHCH₂CH₂), 30.7 (NHCH₂CH₂), 55.3 (OCH₃), 68.6 (OCH₂), 100.2 (*C*_c), 108.9 and 110.7 (*C*₆ and *C*₈), 111.1 and 111.2 (*C*_b and *C*_f), 112.0 and 112.1 (*C*_e and *C*₃), 114.5 (*C*₁₀), 115.7 and 115.9 (*C*₆), 117.3 and 117.5 (*C*₅), 123.2, 123.3, 123.3 and 123.3 (*C*₂), 123.4 (*C*_a), 127.5 (*C*_h), 131.4 (*C*_g), 134.6, 134.7, 134.7 and 134.8 (*C*₁), 135.0 (*C*₇), 147.4, 147.5, 148.1 and 148.2 (*C*₃), 149.9, 150.0, 150.6 and 150.7 (*C*₄), 153.0 (*C*_a), 153.7 (*C*₂), 157.0 and 157.5 (*C*₅ and *C*₉), 158.9 (CO), 176.6 (*C*₄). **MS** (ESI) *m/z* 503 [M-H]⁻, 505 [M+H]⁺, 527 [M+Na]⁺. **Anal. Calcd for C₂₈H₂₂F₂N₂O₅**: C, 66.65; H, 4.40; N, 5.55. Found: C, 66.57; H, 4.36; N, 5.49.

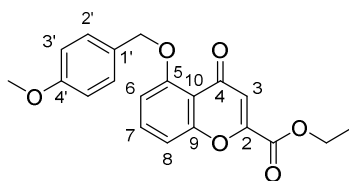
○ Synthesis of compound **16**



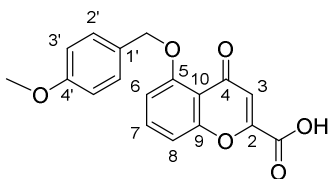
6-(4'-Methoxybenzyloxy)-2-hydroxyacetophenone (12). The crude was prepared according to general procedure A starting from 2,6-dihydroxyacetophenone (2 g, 1.3 mmol) and 4-methoxybenzyl chloride (244 mg, 1.6 mmol) and was purified by flash silica column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (8:2) as eluent to afford **12** as a cream coloured solid (1.3 g, 36%). C₁₆H₁₆O₄. **m.p.** 125-127°C. **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.50 (s, 3H, COCH₃), 3.76 (s, 3H, OCH₃), 5.08 (s, 2H, OCH₂), 6.50 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, *H*₃ or *H*₅), 6.66 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, *H*₃ or *H*₅), 6.95 (dd, 2H, *J* = 1.9 Hz, *J* = 8.4 Hz, *H*₂), 7.31 (t, 1H, *J* = 8.1 Hz, *H*₄), 7.40 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, *H*₃), 11.80 (s, 1H, OH). **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ 33.1 (COCH₃), 55.1 (OCH₃), 70.0 (OCH₂), 103.4 and 109.4 (*C*₃ and *C*₅), 113.8 (*C*₃), 114.3 (*C*₁), 128.3 and 129.7 (*C*₂ and *C*₄), 134.1 (*C*₁), 158.5, 159.1 and 160.0 (*C*₂, *C*₆ and *C*₄), 203.7 (CO). **MS** (ESI) *m/z* 271 [M-H]⁻.



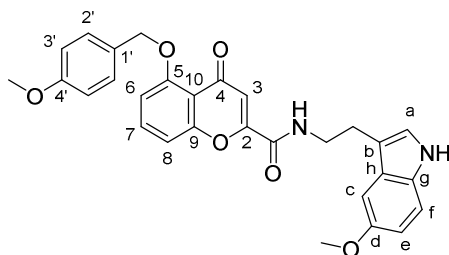
5-Hydroxy-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid ethyl ester (13). To a solution of **2** (2 g, 5.0 mmol) in anhydrous ethanol under argon was added activated Pd/C (0.1 g/mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature for 3 hours under H₂ environment. The Pd/C was filtered through a pad of celite and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The obtained solid was washed with diethyl ether to afford **13** as a yellow solid (676 mg, 58%). C₁₂H₁₀O₅. **m.p.** 143-145°C. **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1.35 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, OCH₂CH₃), 4.39 (q, 2H, *J* = 7.2 Hz, OCH₂CH₃), 6.88 (dd, 1H, *J* = 0.6 Hz, *J* = 8.2 Hz, *H*₆ or *H*₈), 6.98 (s, 1H, *H*₃), 7.18 (dd, 1H, *J* = 0.7 Hz, *J* = 8.4 Hz, *H*₆ or *H*₈), 7.75 (t, 1H, *J* = 8.4 Hz, *H*₇), 12.16 (s, 1H, OH). **¹³C NMR** (100 MHz, DMSO-d₆) δ 13.8 (OCH₂CH₃), 62.9 (OCH₂CH₃), 107.9 (*C*₆ or *C*₈), 111.2 (*C*₁₀), 111.6 (*C*₆ or *C*₈), 112.7 (*C*₃), 137.1 (*C*₇), 153.2 (*C*₂), 155.6 and 159.4 (*C*₅ and (*C*₉), 159.7 (COO), 183.4 (*C*₄). **MS** (ESI) *m/z* 235 [M+H]⁺, 257 [M+Na]⁺.



5-(4'-Methoxybenzyloxy)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid ethyl ester (14). The crude was prepared according to general procedure A starting from **13** (500 mg, 2 mmol) and 4-methoxybenzylchloride (376 mg, 2.4 mmol) and was washed with diethyl ether to afford **14** as a creamy brown solid (390 mg, 55%). C₂₀H₁₈O₆. **m.p.** 127-130°C. **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-d₆) δ 1.33 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, OCH₂CH₃), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 4.37 (q, 2H, *J* = 7.2 Hz, OCH₂CH₃), 5.17 (s, 2H, OCH₂), 6.73 (s, 1H, *H*₃), 6.95 (m, 2H, *H*_{3'}), 7.11 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, *H*₆ or *H*₈), 7.20 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, *H*₆ or *H*₈), 7.49 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, *H*_{2'}), 7.72 (t, 1H, *J* = 8.4 Hz, *H*₇). **¹³C NMR** (100 MHz, DMSO-d₆) δ 13.5 (OCH₂CH₃), 55.1 (OCH₃), 62.5 (OCH₂CH₃), 69.9 (OCH₂), 109.2 and 110.3 (*C*₆ and *C*₈), 113.7 (*C*_{3'}), 114.8 (*C*₁₀), 115.4 (*C*₃), 128.5 and 128.6 (*C*_{2'} and *C*₇), 135.2 (*C*_{1'}), 150.1 (*C*₂), 157.3 and 158.1 and 158.8 (*C*₅, *C*₉ and *C*_{4'}), 160.0 (CO), 176.3 (*C*₄). **MS** (ESI) *m/z* 377 [M+Na]⁺.



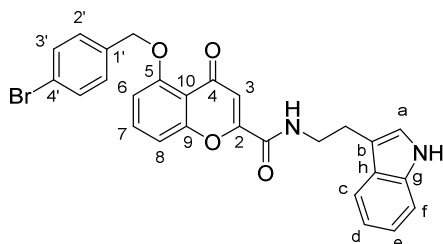
5-(4'-Methoxybenzyloxy)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid (15). The crude was prepared according to general procedure C starting from **14** (373 mg, 1.1 mmol) and was washed with diethyl ether to afford **15** as a cream solid (231 mg, 62%). $C_{18}H_{14}O_6$. **m.p.** 130-131°C. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 3.76 (s, 3H, OCH_3), 5.17 (s, 2H, OCH_2), 6.71 (s, 1H, H_3), 6.96 (m, 2H, $H_{3'}$), 7.10 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, H_6 or H_8), 7.19 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, H_6 or H_8), 7.50 (m, 2H, $H_{2'}$), 7.71 (t, 1H, $J = 8.4$ Hz, H_7). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 55.1 (OCH_3), 69.9 (OCH_2), 109.0 and 110.3 (C_6 and C_8), 113.7 ($C_{3'}$), 114.7 (C_{10}), 115.1 (C_3), 128.6 (C_7 and $C_{2'}$), 135.0 ($C_{1'}$), 151.4 (C_2), 157.4, 158.0 and 158.8 (C_5 , C_9 and C_4), 161.5 (CO), 176.7 (C_4). **MS** (ESI) m/z 325 $[M-H]^-$, 327 $[M+H]^+$, 349 $[M+Na]^+$.



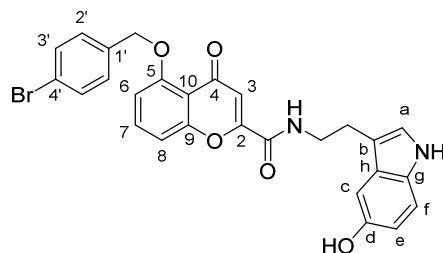
5-(4'-Methoxybenzyloxy)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid [2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)-ethyl]-amide (16). The crude was prepared according to general procedure D₁ starting from **15** (201 mg, 0.6 mmol) and 5-methoxytryptamine hydrochloride (114 mg, 0.6 mmol) to afford **16** as a cream solid (61 mg, 20%). $C_{29}H_{26}N_2O_6$. **m.p.** 202-204°C. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.95 (t, 2H, $J = 7.4$ Hz, NCH_2CH_2), 3.56 (q, 2H, $J = 6.6$ Hz, NCH_2CH_3), 3.73 (s, 3H, OCH_3), 3.76 (s, 3H, OCH_3), 5.18 (s, 2H, OCH_2), 6.65 (s, 1H, H_3), 6.71 (dd, 1H, $J = 2.0$ Hz, $J = 8.4$ Hz, H_e), 6.96 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz, $H_{3'}$), 7.07 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz, H_c), 7.11 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, H_6 or H_8), 7.16 (d, 1H, $J = 1.9$ Hz, H_a), 7.22 (m, 2H, H_6 or H_8 , H_f), 7.51 (d, 2H, $J = 8.6$ Hz, $H_{2'}$), 7.74 (t, 1H, $J = 8.4$ Hz, H_7), 9.17 (t, 1H, $J = 7.2$ Hz, CONH), 10.68 (s, 1H, indole NH). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 24.9 ($NHCH_2CH_2$), under peak of DMSO ($NHCH_2CH_2$), 55.1 (OCH_3), 55.3 (OCH_3), 69.9 (OCH_2), 100.2 (C_c), 109.1 and 110.3 (C_6 and C_8), 111.1 and 111.2 (C_b and C_f), 112.0 (C_e and C_3), 113.7 ($C_{3'}$), 114.5 (C_{10}), 123.4 (C_a), 127.5 (C_h), 128.5 (C_g), 128.6 ($C_{2'}$), 131.4 (C_7), 134.9 ($C_{1'}$), 153.0 and

153.5 (C_2 and C_d), 157.0 and 158.0 (C_5 and C_9), 158.8 (CO), 158.9 ($C_{4'}$), 176.5 (C_4). **MS** (ESI) m/z 521 $[M+Na]^+$. **Anal.** Calcd for $C_{29}H_{26}N_2O_6$: C, 69.87; H, 5.26; N, 5.62. Found: C, 66.91; H, 5.09; N, 5.37.

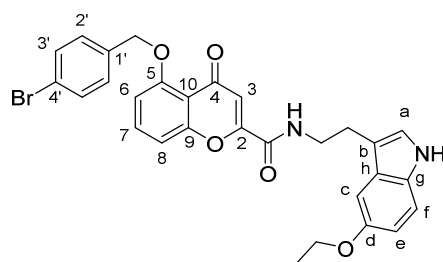
II.1.3.4 Modulation of nature and position of groups on the indolic ring - Synthesis of compounds 17a to 17f



5-(4'-Bromobenzyloxy)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid [2-(1H-indol-3-yl)-ethyl]-amide (17a). The crude was prepared according to general procedure D₁ starting from **3** (200 mg, 0.5 mmol) and commercially available tryptamine hydrochloride (98 mg, 0.5 mmol) and was purified by flash silica column chromatography using dichloromethane/ methanol (95:5) as eluent to afford **17a** as a white solid (80 mg, 31%). $C_{27}H_{21}BrN_2O_4$. **m.p.** 221°C. **¹H NMR** (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.98 (t, 2H, $J = 7.9$ Hz, $NHCH_2CH_2$), 3.58 (m, 2H, $NHCH_2CH_2$), 5.25 (s, 2H, OCH_2), 6.67 (s, 1H, H_3), 6.96-7.35 (m, 6H, H_6 , H_8 , H_a , H_d , H_e , H_f), 7.58-7.63 (m, 5H, H_2 , H_3 , H_c), 7.77 (t, 1H, $J = 8.4$ Hz, H_7), 9.20 (t, 1H, $J = 5.7$ Hz, CONH), 10.8 (s, 1H, indole NH). **¹³C NMR** (100 MHz, DMSO- d_6) δ 24.8 ($NHCH_2CH_2$), under peak of DMSO ($NHCH_2CH_2$), 69.2 (OCH_2), 109.0 and 110.6 (C_6 and C_8), 111.4 (C_b and C_f), 112.1 (C_3), 114.5 (C_{10}), 118.2 and 118.3 (C_c and C_d), 120.6 ($C_{4'}$), 121.0 (C_e), 122.7 (C_a), 127.2 (C_h), 128.9 ($C_{2'}$), 131.2 ($C_{3'}$), 135.0 (C_7), 136.2 and 136.3 ($C_{1'}$ and C_g), 153.6 (C_2), 157.0 (C_9), 157.7 (C_5), 158.9 (CO), 176.6 (C_4). **MS** (ESI) m/z 539 (^{79}Br), 541 (^{81}Br) $[M+Na]^+$. **Anal.** Calcd for $C_{27}H_{21}BrN_2O_4$: C, 62.67; H, 4.10; N, 5.41. Found: C, 62.45; H, 4.12; N, 5.48.

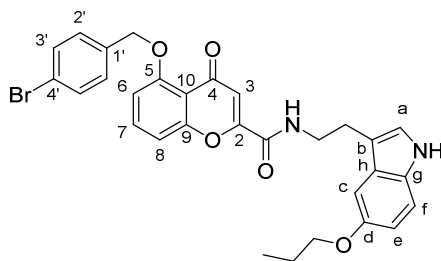


5-(4'-Bromobenzyloxy)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid [2-(5-hydroxy-1H-indol-3-yl)-ethyl]-amide (17b). The crude was prepared according to general procedure D₁ starting from **3** (1 g, 2.66 mmol) and commercially available serotonin hydrochloride (567 mg, 2.7 mmol) and was washed with diethylether to afford **17b** as a white solid (794 mg, 56%). C₂₇H₂₁BrN₂O₅. **m.p.** 222-225°C. **¹H NMR** (DMSO-d₆, 400 MHz) δ 2.88 (t, 2H, *J* = 8 Hz, NHCH₂CH₂), 3.53 (m, 2H, NHCH₂CH₂), 5.24 (s, 2H, OCH₂), 6.59 (dd, 1H, *J* = 2.4 Hz, *J* = 8.8 Hz, *H_e*), 6.68 (s, 1H, *H₃*), 6.89 (d, 1H, *J* = 2 Hz, *H_c*), 7.10-7.14 (m, 3H, *H₆* or *H₈*, *H_a*, *H_f*), 7.25 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, *H₆* or *H₈*), 7.60 (m, 4H, *H_{2'}*, *H_{3'}*), 7.76 (t, 1H, *J* = 8.4 Hz, *H₇*), 8.60 (t, 1H, *J* = 5.6 Hz, CONH), 9.17 (s, 1H, indole NH). **¹³C NMR** (DMSO-d₆, 100 MHz) δ 25.0 (NHCH₂CH₂), under peak of DMSO (NHCH₂CH₂), 69.2 (OCH₂), 102.2 (*C_c*), 108.9 (*C₆* or *C₈*), 110.4 and 110.6 (*C_b* and *C₆* or *C₈*), 111.3 (*C_e*), 111.7 (*C_f*), 112.1 (*C₃*), 114.5 (*C₁₀*), 120.6 (*C_{4'}*), 123.2 (*C_a*), 127.9 (*C_h*), 128.9 (*C_{2'}*), 130.8 (*C_g*), 131.2 (*C_{2'}*), 135.0 (*C₇*), 136.3 (*C_{1'}*), 150.2 (*C_d*), 153.6 (*C₂*) 157.0 (*C₉*), 157.7 (*C₅*), 158.9 (CO), 176.8 (*C₄*). **MS** (ESI) *m/z* 533 (⁷⁹Br), 535 (⁸¹Br) [M+H]⁺. **Anal. Calcd for C₂₇H₂₁BrN₂O₄:** C, 60.80; H, 3.97; N, 5.25. Found: C, 59.66; H, 3.76; N, 5.41.



5-(4'-Bromobenzyloxy)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid [2-(5-ethoxy-1H-indol-3-yl)-ethyl]-amide (17c). The crude was prepared according to general procedure E starting from **17b** (200 mg, 0.4 mmol) and iodoethane (56 mg, 0.4 mmol) and was purified by flash silica column chromatography, using dichloromethane/methanol (99:1) as eluent to afford **17c** as a white solid (36.5 mg, 17%). C₂₉H₂₅BrN₂O₅. **m.p.** 234-236°C. **¹H NMR** (DMSO-d₆, 400

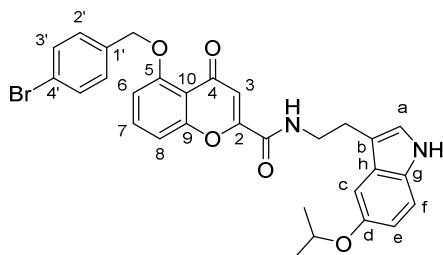
MHz) δ 1.28 (t, 3H, $J = 6.8$ Hz, OCH_2CH_3), 2.92 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz, NHCH_2CH_2), 3.53 (q, 2H, $J = 6.8$ Hz, NHCH_2CH_2), 3.94 (q, 2H, $J = 6.8$ Hz, OCH_2CH_3), 5.23 (s, 2H, OCH_2), 6.64 (s, 1H, H_3), 6.68 (dd, 1H, $J = 2.0$ Hz, $J = 8.4$ Hz, H_e), 7.06-7.24 (m, 5H, H_6 , H_8 , H_a , H_c , H_f), 7.58 (m, 4H, H_2 , H_3), 7.74 (t, 1H, $J = 8.4$ Hz, H_7), 9.15 (t, 1H, $J = 5.6$ Hz, CONH), 10.64 (s, 1H, indole NH). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 14.9 (OCH_2CH_3), under peak of DMSO (NHCH_2CH_2), 24.8 (NHCH_2CH_2), 63.3 (OCH_2CH_3), 69.2 (OCH_2), 101.2 (C_c), 109.0 and 110.6 (C_6 and C_8), 111.2 and 111.5 (C_b and C_f), 111.9 and 112.0 (C_e and C_3), 114.5 (C_{10}), 120.6 ($C_{4'}$), 123.5 (C_a), 127.6 (C_h), 128.9 ($C_{2'}$), 131.2 ($C_{3'}$), 131.4 (C_g), 134.9 (C_7), 136.3 ($C_{1'}$), 152.1 and 153.6 (C_2 and C_d), 157.0 and 157.7 (C_5 and C_9), 158.9 (CONH), 176.5 (C_4). MS (ESI) m/z 561 (^{79}Br), 563 (^{81}Br) $[\text{M}+\text{H}]^+$; 583 (^{79}Br), 585 (^{81}Br) $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{25}\text{BrN}_2\text{O}_5$: C, 62.04; H, 4.49; N, 4.99. Found: C, 61.82; H, 4.28; N, 4.75.



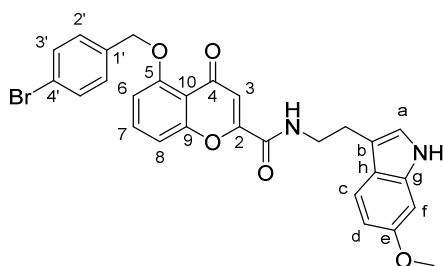
5-(4'-Bromobenzoyloxy)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid [2-(5-propyloxy-1H-indol-3-yl)-ethyl]-amide (17d). The crude was prepared according to general procedure E starting from **17b** (200 mg, 0.4 mmol) and 1-iodopropane (60 mg, 0.4 mmol) and was purified by flash silica column chromatography using dichloromethane/methanol (99:1) as eluent to afford **17d** as a white solid (67 mg, 31%). $\text{C}_{30}\text{H}_{27}\text{BrN}_2\text{O}_5$. m.p. 203-206°C. ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 0.94 (t, 3H, $J = 7.6$ Hz, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.66 (sex, 2H, $J = 7.2$ Hz, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2.93 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz, NHCH_2CH_2), 3.55 (q, 2H, $J = 6.4$ Hz, NHCH_2CH_2), 3.86 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 5.23 (s, 2H, OCH_2), 6.66 (s, 1H, H_3), 6.70 (dd, 1H, $J = 2.0$ Hz, $J = 8.8$ Hz, H_e), 7.15 (m, 5H, H_6 , H_8 , H_a , H_c , H_f), 7.60 (m, 4H, H_2 , H_3), 7.76 (t, 1H, $J = 8.8$ Hz, H_7), 9.17 (t, 1H, $J = 5.6$ Hz, CONH), 10.66 (s, 1H, indole NH). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 10.4 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 22.2 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 24.8 (NHCH_2CH_2), under peak of DMSO (NHCH_2CH_2), 69.1 and 69.4 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ and OCH_2), 101.1 (C_c), 108.9 and 110.5 (C_6 and C_8), 111.2 and 111.4 (C_b and C_f), 111.9 and 112.0 (C_3 and C_e), 114.4 (C_{10}), 120.5 ($C_{4'}$), 123.3 (C_a), 127.5 (C_h), 128.8 ($C_{2'}$), 131.1 ($C_{3'}$), 131.3 (C_g), 134.8 (C_7), 136.2 ($C_{1'}$), 152.2 (C_d), 153.5 (C_2), 156.9 (C_9), 157.6 (C_5), 158.8 (CO), 176.4 (C_4). MS (ESI)

PARTIE EXPÉRIMENTALE

m/z 575 (^{79}Br), 577 (^{81}Br) $[\text{M}+\text{H}]^+$; 597 (^{79}Br), 599 (^{81}Br) $[\text{M}+\text{Na}]^+$. **Anal.** Calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{27}\text{BrN}_2\text{O}_5$: C, 62.62; H, 4.73; N, 4.87. Found: C, 61.92; H, 4.77; N, 4.97.



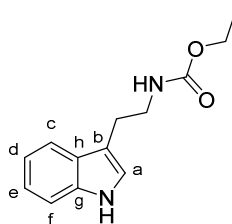
5-(4'-Bromobenzyloxy)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid [2-(5-isopropoxy-1H-indol-3-yl)-ethyl]-amide (17e). The crude was prepared according to general procedure E starting from **17b** (280 mg, 0.5 mmol) and 2-iodopropane (89 mg, 0.5 mmol) and was purified by flash silica column chromatography using dichloromethane/methanol (99:1) as eluent to afford **17e** as a white solid (90 mg, 30%). $\text{C}_{30}\text{H}_{27}\text{BrN}_2\text{O}_5$. **m.p.** 240-243°C. ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 1.20 (s, 3H, $\text{OCH}(\text{CH}_3)_2$), 1.21 (s, 3H, $\text{OCH}(\text{CH}_3)_2$), 2.93 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz, NHCH_2CH_2), 3.54 (q, 2H, $J = 7.0$ Hz, NHCH_2CH_2), 4.46 (sept, 1H, $J = 6.0$ Hz, $\text{OCH}(\text{CH}_3)_2$), 5.24 (s, 2H, OCH_2), 6.66 (s, 1H, H_3), 6.69 (dd, 1H, $J = 2.3$ Hz, $J = 8.7$ Hz, H_e), 7.07-7.26 (m, 5H, H_6 , H_8 , H_a , H_c , H_f), 7.60 (m, 4H, $H_{2'}$, $H_{3'}$), 7.76 (t, 1H, $J = 8.4$ Hz, H_7), 9.17 (t, 1H, $J = 5.9$ Hz, CONH), 10.65 (s, 1H, indole NH). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ 22.1 ($\text{OCH}(\text{CH}_3)_2$), 24.9 (NHCH_2CH_2), under peak of DMSO (NHCH_2CH_2), 69.2 ($\text{OCH}(\text{CH}_3)_2$), 70.2 (OCH_2), 104.0 (C_c), 109.0 and 110.7 (C_6 and C_8), 111.3 and 112.0 (C_b and (C_f), 112.1 and 113.0 (C_e and C_3), 114.5 (C_{10}), 120.7 ($C_{4'}$), 123.6 (C_a), 127.8 (C_h), 129.0 ($C_{2'}$), 131.3 ($C_{3'}$), 131.7 (C_g), 135.0 (C_7), 136.3 ($C_{1'}$), 150.8 (C_d), 153.7 (C_2), 157.1 (C_9), 157.7 (C_5), 159.0 (CO), 176.7 (C_4). **MS** (ESI) m/z 575 (^{79}Br), 576 (^{81}Br) $[\text{M}+\text{H}]^+$. **Anal.** Calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{27}\text{BrN}_2\text{O}_5$: C, 62.62; H, 4.73; N, 4.87. Found: C, 64.16; H, 4.75; N, 4.85.



5-(4'-Bromobenzyloxy)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid [2-(6-methoxy-1H-indol-3-yl)-ethyl]-amide (17f). The crude was prepared according to general procedure D₁ starting from **3** (197 mg, 0.5 mmol) and commercially available 6-methoxytryptamine hydrochloride (100 mg, 0.5 mmol) and was purified by flash silica column chromatography using dichloromethane/ethyl acetate (9:1 to 8:2) as eluent to afford **17f** as a white solid (30 mg, 11%). C₂₈H₂₃BrN₂O₅. **m.p.** 190-193°C. ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ 2.93 (t, 2H, *J* = 7.7 Hz, NHCH₂CH₂), 3.55 (q, 2H, *J* = 6.5 Hz, NHCH₂CH₂), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 5.24 (s, 2H, OCH₂), 6.64 (dd, 1H, *J* = 2.3 Hz, *J* = 8.6 Hz, *H_d*), 6.66 (s, 1H, *H₃*), 6.83 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz, *H_f*), 7.05 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz, *H_a*), 7.10 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz, *H₆* or *H₈*), 7.25 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, *H₆* or *H₈*), 7.45 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz, *H_c*), 7.60 (m, 4H, *H_{2'}*, *H_{3'}*), 7.76 (t, 1H, *J* = 8.4 Hz, *H₇*), 9.17 (t, 1H, *J* = 5.7 Hz, CONH), 10.62 (s, 1H, indole NH). ¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz) δ 24.9 (NHCH₂CH₂), under peak of DMSO (NHCH₂CH₂), 55.1 (OCH₃), 69.2 (OCH₂), 94.5 (*C_f*), 108.5 (*C_d*), 108.9 (*C₆* or *C₈*), 110.5 (*C₆* or *C₈*), 111.4 (*C_b*), 112.0 (*C₃*), 114.5 (*C₁₀*), 118.8 (*C_c*), 120.6 (*C_a*), 121.2 (*C_{4'}*), 121.6 (*C_h*), 128.9 (*C_{2'}*), 131.2 (*C_{3'}*), 134.9 (*C₇*), 136.3 (*C_{1'}*), 136.9 (*C_g*), 153.6 (*C₂*), 155.5 (*C_e*), 157.0 (*C₉*), 157.7 (*C₅*), 158.8 (CO), 176.5 (*C₄*). **MS** (ESI) *m/z* 545 (⁷⁹Br), 547 (⁸¹Br) [M-H]⁻; 581 (⁷⁹Br), 583 (⁸¹Br) [M+Cl]⁻. **Anal.** Calcd for C₂₈H₂₃BrN₂O₅: C, 61.44; H, 4.24; N, 5.12. Found: C, 61.05; H, 4.24; N, 4.91.

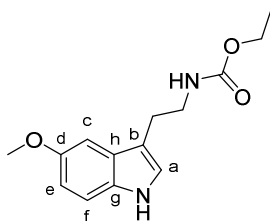
II.1.3.5 Methylation of indolic and amidic nitrogen – Synthesis of compounds 25a to 25h

○ Synthesis of tryptamine derivatives

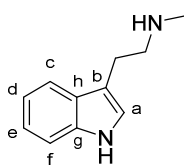


N-Ethoxycarbonyltryptamine (18a). The crude was prepared according to general procedure F starting from commercially available tryptamine (1.9 g, 11.9 mmol) to afford **18a** as an orange oil (2.5 g, 90%). C₁₃H₁₆N₂O₂. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.23 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, OCH₂CH₃), 2.97 (t, 2H, *J* = 6.8 Hz, NHCH₂CH₂), 3.52 (m, 2H, NHCH₂CH₂), 4.11 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, OCH₂CH₃), 4.73 (s, 1H, NH), 7.03 (s, 1H, *H_a*), 7.10-7.23 (m, 2H, *H_d* and *H_e*), 7.37

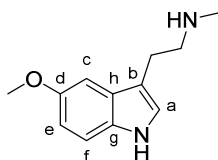
(d, 1H, $J = 8.1$ Hz, H_f), 7.61 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz, H_c), 8.11 (s, 1H, indole NH). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 14.7 (OCH_2CH_3), 25.8 (NHCH_2CH_2), 41.3 (NHCH_2CH_2), 60.8 (OCH_2CH_3), 111.3 (C_f), 112.9 (C_b), 118.8 (C_c), 119.4 (C_e), 122.2 (C_d), 122.3 (C_a), 127.4 (C_h), 136.5 (C_g), 156.9 (CO). MS (ESI) m/z observed for $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_2$, 201 $[\text{M}]^-$, 203 $[\text{M}]^+$.



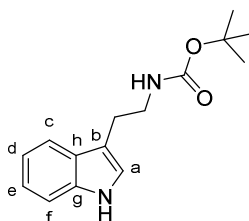
5-Methoxy-N-ethoxycarbonyltryptamine (18b). The crude was prepared according to general procedure F starting from commercially available 5-methoxytryptamine hydrochloride (1 g, 4.4 mmol) to afford **18b** as an orange oil (1 g, 90%). $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.27 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz, OCH_2CH_3), 2.98 (t, 2H, $J = 6.7$ Hz, NHCH_2CH_2), 3.56 (m, 2H, NHCH_2CH_2), 3.91 (s, 3H, OCH_3), 4.15 (q, 2H, $J = 7.1$ Hz, OCH_2CH_3), 4.82 (s, 1H, NHCO), 6.91 (dd, 1H, $J = 2.4$ Hz, $J = 8.8$ Hz, H_e), 7.04 (s, 1H, H_a), 7.08 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz, H_c), 7.29 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, H_f), 8.13 (s, 1H, indole NH). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 14.7 (OCH_2CH_3), 25.9 (NHCH_2CH_2), 41.3 (NHCH_2CH_2), 56.0 (OCH_3), 65.9 (OCH_2CH_3), 100.8 (C_c), 112.0 and 112.4 (C_e and C_f), 112.8 (C_b), 123.0 (C_a), 127.8 (C_h), 131.7 (C_g), 154.1 (C_d), 156.8 (CO). MS (ESI) m/z 261 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 285 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.



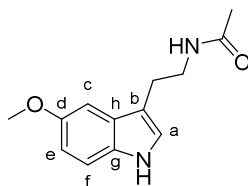
N-Methyltryptamine (19a). The crude was prepared according to general procedure G starting from **18a** (1 g, 4.3 mmol) to afford **19a** as a white solid (chlorhydrate form, 652 mg, 72%). $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_2$. m.p. 83-85°C. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 2.31 (s, 3H, NHCH_3), 2.72-2.83 (m, 4H, NHCH_2CH_2), 6.94-7.07 (m, 2H, H_d , H_e), 7.12 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz, H_a), 7.32 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, H_f), 7.50 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz, H_c), 10.77 (s, 1H, indole NH). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 25.2 (NHCH_2CH_2), 36.1 (NHCH_2CH_2), 52.4 (CH_3), 111.3 (C_f), 112.6 (C_b), 118.1 and 118.2 (C_c and C_e), 120.7 (C_d), 122.5 (C_a), 127.2 (C_h), 136.2 (C_g). MS (ESI) m/z 173 $[\text{M}-\text{H}]^+$.



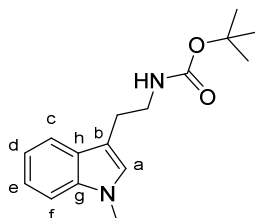
5-Methoxy-N-methyltryptamine (19b). The crude was prepared according to general procedure G from **19a** (500 mg, 1.9 mmol) to afford **19b** as a yellow oil (387 mg, 80%). $C_{12}H_{16}N_2O$. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 2.45 (s, 3H, $NHCH_3$), 2.89-2.98 (m, 4H, $NHCH_2CH_2$), 3.86 (s, 3H, OCH_3), 6.85 (dd, 1H, $J = 2.4$ Hz, $J = 8.8$ Hz, H_e), 7.00 (s, 1H, H_a), 7.07 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz, H_c), 7.24 (dd, 1H, $J = 0.4$ Hz, $J = 8.8$ Hz, H_f), 8.13 (s, 1H, indole NH). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 25.7 ($NHCH_2CH_2$), 36.4 ($NHCH_3$), 52.1 (OCH_3), 56.1 ($NHCH_2CH_2$), 100.9 (C_c), 112.0 and 112.3 (C_e and C_f), 113.8 (C_b), 122.9 (C_a), 128.0 (C_h), 131.7 (C_g), 154.1 (C_d). MS (ESI) m/z 203 $[M-H]^-$.



N-BOCtryptamine (20a). To a solution of tryptamine (free base, 500 mg, 3.1 mmol) in dichloromethane (6.5 mL/mmol) were added di-*tert*-butyl dicarbonate (763 mg, 3.5 mmol) and triethylamine (941 mg, 9.3 mmol) and the resulting mixture was stirred at room temperature for 24h. The mixture was poured into water and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with water, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to afford **20a** as an orange oil with triethylamine (99%). $C_{15}H_{20}N_2O_2$. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1.43 (s, 9H, $OC(CH_3)_3$), 2.94 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz, $NHCH_2CH_2$), 3.45 (m, 2H, $NHCH_2CH_2$), 4.65 (s, 1H, NH) 7.01 (s, 1H, H_a), 7.10-7.21 (m, 2H, H_d and H_e), 7.36 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, H_f), 7.59 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz, H_c), 8.35 (s, 1H, indole NH). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 25.5 ($NHCH_2CH_2$), 28.3 ($OC(CH_3)_3$), 40.8 ($NHCH_2CH_2$), 77.4 ($OC(CH_3)_3$), 111.3 (C_f), 111.8 (C_b), 118.1 and 118.2 (C_c and C_e), 120.8 (C_d), 122.5 (C_a), 127.3 (C_h), 136.2 (C_g), 155.6 (CO). MS (ESI) m/z 259 $[M-H]^-$, 295 $[M+Cl]^-$.



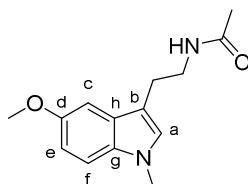
N-Acetyl-5-methoxytryptamine (20b). To a solution of 5-methoxytryptamine hydrochloride (1 g, 4.4 mmol) and potassium carbonate (1.8 g, 13.2 mmol) in water/ethyl acetate (100 ml, 1:1) was added dropwise acetyl chloride (0.3 g, 4.2 mmol). The aqueous layer was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with 1M hydrochloric acid and water, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The obtained solid was washed with diethyl ether to afford **20b** as a white powder (600 mg, 59%). $C_{13}H_{16}N_2O_2$. **m.p.** 115°C. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1.93 (s, 3H, $COCH_3$), 2.94 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz, $NHCH_2CH_2$), 3.59 (q, 2H, $J = 5.6$ Hz, $NHCH_2CH_2$), 3.85 (s, 3H, OCH_3), 5.68 (s, 1H, NH), 6.87 (dd, 1H, $J = 2.3$ Hz, $J = 8.7$ Hz, H_e), 7.02 (m, 2H, H_a , H_c), 7.26 (m, 1H, H_f), 8.10 (s, 1H, indole NH). ^{13}C NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$) δ 23.5 ($COCH_3$), 25.4 ($NHCH_2CH_2$), 40.0 ($NHCH_2CH_2$), 56.1 (OCH_3), 100.6 (C_c), 112.2 and 112.6 (C_e and C_f), 112.8 (C_b), 123.0 (C_a), 127.9 (C_h), 131.7 (C_g), 154.2 (C_d), 170.4 (CO). **MS** (ESI) m/z 255 $[M + Na]^+$.



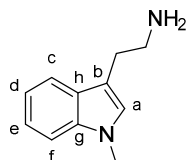
1-Methyl-N-BOCtryptamine (21a). To a solution of **20a** (500 mg, 1.9 mmol) in dichloromethane (10 mL) were added sodium hydroxide (308 mg, 7.7 mmol) and tetrabutylammonium bromide (310 mg, 1 mmol) and the resulting mixture was stirred at 0°C. After 30 minutes, iodomethane (545 mg, 3.8 mmol) was added dropwise. The solution was stirred at room temperature for 16h. The resulting mixture was poured into 1M hydrochloric acid and extracted with dichloromethane. The combined organic layers were washed with water, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash silica column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (1:0 to 8:2) as eluent to afford **21a** as a colorless oil (214 mg, 41%).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

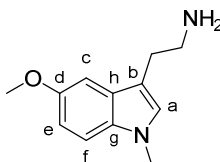
$C_{16}H_{22}N_2O_2$. **1H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1.44 (s, 9H, $OC(CH_3)_3$), 2.94 (t, 2H, $J = 6.7$ Hz, $NHCH_2CH_2$), 3.45 (m, 2H, $NHCH_2CH_2$), 3.76 (s, 3H, NCH_3), 4.60 (s, 1H, NH), 6.89 (s, 1H, H_a), 7.11-7.23 (m, 2H, H_e and H_f), 7.30 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, H_f), 7.59 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz, H_c). **^{13}C NMR** (100 MHz, $CDCl_3$) δ 25.8 ($NHCH_2CH_2$), 28.6 ($OC(CH_3)_3$), 32.7 (NCH_3), 41.2 ($NHCH_2CH_2$), 58.7 ($OC(CH_3)_3$), 109.4 (C_b and C_f), 119.0 and 119.1 (C_c and C_e), 121.8 (C_a and C_d), 126.9 (C_h), 137.3 (C_g), 156.1 (CO). **MS** (ESI) m/z 297 $[M+Na]^+$.



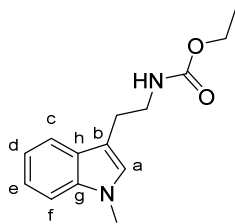
***N*-Acetyl-5-methoxy-1-methyltryptamine (21b).** To a solution of **20b** (500 mg, 2.1 mmol) dissolved in dichloromethane/tetrahydrofuran (20 ml, 1:1) were added tetrabutylammonium bromide (cat) and sodium hydroxyde (230 mg, 5.7 mmol) at 0°C. The resulting mixture was stirred at 0°C for 1 hour and iodomethane (300 mg, 2.1 mmol) was added dropwise. The solution was stirred at 0°C for 1 hour and at room temperature overnight. The mixture was poured into 1M hydrochloric acid and extracted with dichloromethane. The combined organic layers were washed with water, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by flash silica column chromatography using cyclohexane/acetone (6:4) as eluent to afford **21b** as a yellow powder (318 mg, 62%). $C_{14}H_{18}N_2O_2$. **m.p.** 98°C. **1H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1.81 (s, 3H, $COCH_3$), 2.77 (t, 2H, $J = 7.4$ Hz, $NHCH_2CH_2$), 3.29 (q, 2H, $J = 6.9$ Hz, $NHCH_2CH_2$), 3.70 (s, 3H, NCH_3), 3.77 (s, 3H, OCH_3), 6.78 (dd, 1H, $J = 2.4$ Hz, $J = 8.8$ Hz, H_e), 7.04 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz, H_c), 7.07 (s, 1H, H_a), 7.27 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz, H_f), 7.94 (t, 1H, $J = 5.4$ Hz, NH). **^{13}C NMR** (100 MHz, $DMSO-d_6$) δ 22.7 ($NHCH_2CH_2$), 25.1 ($COCH_3$), 32.4 (NCH_3), under peak of DMSO ($NHCH_2CH_2$), 55.4 (OCH_3), 100.4 (C_c), 110.3, 110.8 and 111.0 (C_b , C_e and C_f), 127.6 (C_a), 127.9 (C_h), 132.0 (C_g), 153.1 (C_d), 169.0 (CO). **MS** (ESI) m/z 245 $[M-H]^-$, 247 $[M + H]^+$, 269 $[M+Na]^+$.



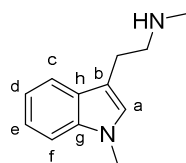
1-Methyltryptamine (22a). Trifluoroacetic acid (2.3 g, 20 mmol) was added to a solution of **21a** (1.4 g, 5 mmol) in dichloromethane (8 mL/mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature overnight. The mixture was poured into water and extracted with dichloromethane. The combined organic layers were washed with 15% sodium hydroxide and water, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by flash silica column chromatography, using dichloromethane/methanol (98:2 to 8:2) as eluent to afford **22a** as a colorless oil (200 mg, 23%). $C_{11}H_{14}N_2$. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 2.87-2.96 (m, 4H, $NH_2CH_2CH_2$), 3.70 (s, 3H, NCH_3), 6.86 (s, 1H, H_a), 7.06-7.22 (m, 2H, H_d and H_e), 7.25-7.27 (m, 1H, H_f), 7.54 (d, 1H, J = 7.9 Hz, H_c). ^{13}C NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$) δ 22.9 ($NH_2CH_2CH_2$), 32.3 (NCH_3), under peak of DMSO ($NH_2CH_2CH_2$), 108.8 and 109.7 (C_f and C_b), 118.3 and 118.6 (C_c and C_d), 121.3 (C_e), 127.1 (C_a), 127.7 (C_h), 136.7 (C_g). **MS** (ESI) m/z 175 $[M+H]^+$.



5-methoxy-1-methyltryptamine hydrochloride (22b). To a solution of **21b** (252 mg, 1 mmol) in ethanol/water (50 ml/mmol, 1:1) was added sodium hydroxide (1.2 g, 30 mmol) and the resulting mixture was refluxed overnight. The solution was poured into 6M hydrochloric acid and extracted with diethyl ether. The aqueous layers were neutralised with potassium carbonate and extracted with dichloromethane. The combined organic layers were washed with water, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered, concentrated under reduced pressure to afford **22b** as a yellow oil (115 mg, 56%). $C_{12}H_{16}N_2O$. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 2.84-3.06 (m, 4H, $NH_2CH_2CH_2$), 3.71 (m, 3H, NCH_3), 3.86 (m, 3H, OCH_3), 6.86-7.20 (m, 4H, H_a , H_c , H_e , H_f). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 29.4 ($NH_2CH_2CH_2$), 32.9 (NCH_3), 42.6 ($NH_2CH_2CH_2$), 56.2 (OCH_3), 101.0 (C_c), 110.1, 111.8 and 111.9 (C_b , C_e and C_f), 127.7 (C_a), 128.3 (C_h), 132.7 (C_g), 153.8 (C_d). **MS** (ESI) m/z 205 $[M+H]^+$.

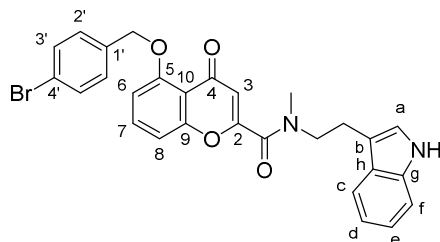


1-Methyl-N-ethoxycarbonyltryptamine (23). The crude was prepared according to general procedure H starting from **18a** (2.3 g, 10 mmol) and was purified by flash silica column chromatography, using cyclohexane/acetone (1:9 to 2:8) as eluent to afford **23** as a colorless oil (1.7 g, 70%). $C_{14}H_{18}N_2O_2$. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1.23 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz, OCH_2CH_3), 2.96 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz, $NHCH_2CH_2$), 3.49 (m, 2H, $NHCH_2CH_2$), 3.75 (s, 3H, NCH_3), 4.11 (q, 2H, $J = 6.7$ Hz, OCH_2CH_3), 4.74 (s, 1H, NH), 6.88 (s, 1H, H_a), 7.10-7.26 (m, 2H, H_e, H_d), 7.30 (m, 1H, H_f), 7.59 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz, H_c). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 14.8 (OCH_2CH_3), 25.8 (CH_2CH_2NH), 32.7 (NCH_3), 41.5 (CH_2CH_2NH), 58.6 (OCH_2CH_3), 109.4 (C_f), 111.5 (C_b), 118.9 and 119.0 (C_c and C_e), 121.8 (C_d), 126.9 (C_a), 127.8 (C_h), 137.2 (C_g) 156.79 (CO). MS (ESI) m/z 247 $[M+H]^+$, 269 $[M+Na]^+$.

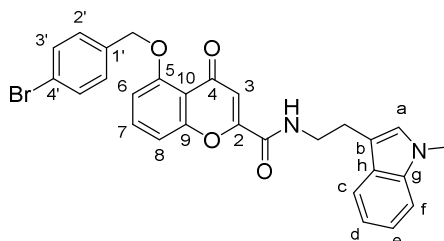


1-Methyl-N-methyltryptamine (24). The crude was prepared according to general procedure G starting from **23** (1 g, 4 mmol) and was diluted in diethyl ether saturated with gaseous hydrochloric acid to afford **24** as a white chlorhydrate salt. (629 mg, 70%). $C_{12}H_{16}N_2$. 1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 2.54 (s, 3H, $NHCH_3$), 3.08 (s, 4H, $NHCH_2CH_2$), 3.73 (s, 3H, indole NCH_3), 7.04-7.18 (m, 2H, H_d, H_e), 7.21 (s, 1H, H_a), 7.40 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, H_f), 7.62 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz, H_c). ^{13}C NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$) δ 21.4 (CH_2CH_2NH), 32.2 (NCH_3), under peak of DMSO (CH_2CH_2NH), 48.6 ($NHCH_3$), 108.6 and 109.6 (C_b and C_f), 118.4 and 118.5 (C_c and C_d), 121.2 (C_e), 127.0 (C_a), 127.6 (C_h), 136.6 (C_g). MS (ESI) m/z 189 $[M+H]^+$.

○ *Synthesis of analogues 25a to 25h*

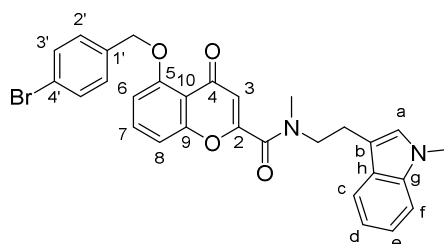


5-(4'-Bromobenzyloxy)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid [2-(1H-indol-3-yl)-ethyl]-methyl-amide (25a). The crude was prepared according to general procedure D₁ starting from **3** (375 mg, 1 mmol) and **19a** (174 mg, 1 mmol) and was purified by flash silica column chromatography, using dichloromethane/methanol (99:1 to 98:2) as eluent to afford **25a** as a white solid (mixture of isomers (6:4)) (170 mg, 32%). C₂₈H₂₃BrN₂O₄. **m.p.** 148–151°C. **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-d₆) δ 3.02 (m, 2H, NCH₂CH₂), 3.04 (s, 1.3H, NCH₃), 3.06 (s, 1.7H, NCH₃), 3.71 (m, 2H, NCH₂CH₂), 5.23 (s, 1.2H, OCH₂), 5.25 (s, 0.8H, OCH₂), 6.05 (s, 0.6H, H₃), 6.31 (s, 0.4H, H₃), 6.59–7.37 (m, 7H, H₆, H₈, H_a, H_c, H_d, H_e, H_f), 7.58–7.71 (m, 5H, H₇, H_{2'}, H_{3'}), 10.81 (s, 0.6H, indole NH), 10.87 (s, 0.4H, indole NH). **¹³C NMR** (100 MHz, DMSO-d₆) δ 22.2, 23.8, 32.9, 36.4, 48.1, 50.9, 64.9, 69.3, 109.0, 109.1, 110.1, 110.3, 110.4, 110.9, 111.3, 111.4, 111.7, 112.0, 114.3, 114.5, 117.5, 118.0, 118.2, 118.3, 120.6, 120.8, 121.0, 123.0, 123.5, 126.6, 127.2, 128.9, 131.2, 134.4, 134.7, 136.1, 136.2, 136.3, 136.4, 155.8, 156.2, 156.9, 157.2, 157.6, 157.7, 161.2, 161.6, 175.4, 175.8. **MS** (ESI) *m/z* 531 (⁷⁹Br), 533 (⁸¹Br) [M+H]⁺; 553 (⁷⁹Br), 555 (⁸¹Br) [M+Na]⁺. **Anal.** Calcd for C₂₈H₂₃BrN₂O₄: C, 63.29; H, 4.36; N, 5.27. Found: C, 63.45; H, 4.50; N, 5.22.



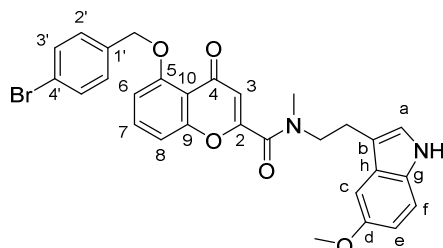
5-(4'-Bromobenzyloxy)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid [2-(1-methyl-1H-indol-3-yl)-ethyl]-amide (25b). To a solution of **22a** (200 mg, 1.1 mmol) in DMF (4 ml) were added successively a solution of **3** (330 mg, 0.9 mmol) in DMF (4 ml), triethylamine (0.5 ml, 4.4 mmol) and bis (2-oxo-3-oxazolidinyl)phosphinic chloride (279 mg, 1.1 mmol). The mixture

was stirred at room temperature overnight. The solution was poured into an aqueous solution of ammonium chloride. The precipitated solid was filtered and was purified by flash silica column chromatography, using dichloromethane/ethyl acetate (95:5 to 9:1) as eluent to afford **25b** as a white solid (467 mg, 19%). $C_{28}H_{23}BrN_2O_4$. **m.p.** 177–180°C. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.99 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz, $NHCH_2CH_2$), 3.57 (q, 2H, $J = 7.0$ Hz, $NHCH_2CH_2$), 3.75 (s, 3H, NCH_3), 5.26 (s, 2H, OCH_2), 6.69 (s, 1H, H_3), 7.00–7.40 (m, 7H, H_6 , H_8 , H_a , H_c , H_d , H_e , H_f), 7.63 (m, 5H, $H_{2'}$, $H_{3'}$), 7.79 (t, 1H, $J = 8.4$ Hz, H_7), 9.24 (t, 1H, $J = 5.7$ Hz, NH). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 24.6 ($NHCH_2CH_2$), 32.1 (NCH_3), under peak of DMSO ($NHCH_2CH_2$), 69.1 (OCH_2), 108.8 and 109.5 (C_6 and C_8), 110.5 and 110.7 (C_b and C_f), 112.0 (C_3), 114.4 (C_{10}), 118.3 and 118.4 (C_c and C_d), 120.5 ($C_{4'}$), 121.0 (C_e), 127.1 and 127.4 (C_a and C_h), 128.8 ($C_{2'}$), 131.1 ($C_{3'}$), 134.8 (C_7), 136.2 and 136.5 ($C_{1'}$ and C_g), 153.5 (C_2), 156.9 and 157.6 (C_5 and C_9), 158.8 (CO), 176.4 (C_4). **MS** (ESI) m/z 531 (^{79}Br), 533 (^{81}Br) [$M+H$] $^+$; 553 (^{79}Br), 555 (^{81}Br) [$M + Na$] $^+$. **Anal.** Calcd for $C_{28}H_{23}BrN_2O_4 \cdot 6/7 H_2O$: C, 61.50; H, 4.55; N, 5.12. Found: C, 61.49; H, 4.40; N, 5.13.

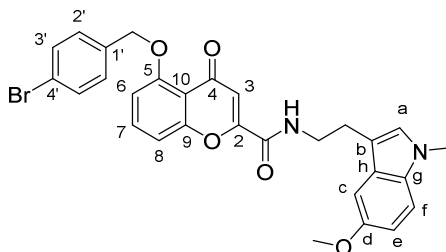


5-(4'-Bromobenzyloxy)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid [2-(1-methyl-1H-indol-3-yl)-ethyl]-methyl-amide (25c). The crude was prepared according to general procedure D₁ starting from **3** (375 mg, 1 mmol) and **24** (250 mg, 1.1 mmol) and was purified by flash silica column chromatography, using dichloromethane/methanol (99:1 to 98:2) as eluent to afford **25c** as a white solid (mixture of isomers (6:4)) (120 mg, 20%). $C_{29}H_{25}BrN_2O_4$. **m.p.** 150–153°C. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.97–3.04 (m, 2H, NCH_2CH_2), 3.09 (s, 3H, $CONCH_3$), 3.68–3.77 (m, 5H, NCH_2CH_2 , indole NCH_3), 5.23 (s, 1.2H, OCH_2), 5.25 (s, 0.8H, OCH_2), 5.95 (s, 0.6H, H_3), 6.32 (s, 0.4H, H_3), 6.64–7.76 (m, 12H, aromatic protons). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 22.1, 23.5, 32.1, 32.2, 32.9, 36.3, 48.1, 51.0, 69.2, 109.0, 109.1, 109.5, 109.6, 110.3, 110.4, 111.8, 112.0, 114.2, 114.5, 117.8, 118.1, 118.4, 118.5, 120.5, 120.9, 121.1, 127.0, 127.4, 127.5, 127.7, 128.9, 131.2, 134.3, 134.7, 136.3, 136.4, 136.5, 136.6, 155.7, 156.8, 157.6, 157.7, 161.2, 161.5, 175.4, 175.8. **MS** (ESI) m/z 545 (^{79}Br),

547 (^{81}Br) $[\text{M} + \text{H}]^+$; 567 (^{79}Br), 569 (^{81}Br) $[\text{M} + \text{Na}]^+$. **Anal.** Calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{25}\text{BrN}_2\text{O}_4$: C, 63.86; H, 4.62; N, 5.14. Found: C, 63.52; H, 4.47; N, 5.37.

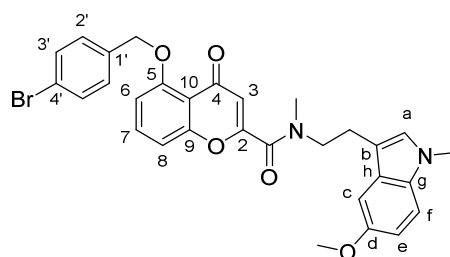


5-(4'-Bromobenzyloxy)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid [2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)-ethyl]-methyl-amide (25d). The crude was prepared according general procedure D₁ from **3** (330 mg, 0.9 mmol) and **19b** (179 mg, 0.9 mmol) and was purified by flash silica column chromatography, using dichloromethane/methanol (99:1 to 98:2) as eluent to afford **25d** as a white solid (mixture of isomers (2:1)) (143 mg, 29%). $\text{C}_{29}\text{H}_{25}\text{BrN}_2\text{O}_5$. **m.p.** 168–171°C. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 2.95–3.00 (m, 2H, NCH_2CH_2), 3.04 (s, 1.1H, NCH_3), 3.06 (s, 1.9H, NCH_3), 3.67–3.77 (m, 5H, NCH_2CH_2 , OCH_3), 5.21 (s, 1.2H, OCH_2), 5.25 (s, 0.8H, OCH_2), 5.67 (s, 0.7H, H_3), 6.31 (s, 0.3H, H_3), 6.44–7.77 (m, 11H, aromatic protons), 10.65 (s, 0.7H, indole NH), 10.70 (s, 0.3H, indole NH). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 22.2, 23.6, 32.9, 36.4, 47.9, 50.6, 54.8, 55.3, 69.2, 99.1, 100.2, 108.9, 109.8, 110.2, 111.0, 111.1, 111.7, 112.0, 120.5, 123.6, 124.2, 126.9, 127.5, 128.8, 128.9, 131.1, 131.2 (C_7), 131.3, 134.3, 134.7, 136.4, 152.8, 153.0, 155.5, 156.2, 156.7, 157.2, 157.5, 157.6, 161.2, 161.6, 175.3, 175.7. **MS** (ESI) m/z 561 (^{79}Br), 562 (^{81}Br) $[\text{M} + \text{H}]^+$; 583 (^{79}Br), 584 (^{81}Br) $[\text{M} + \text{Na}]^+$. **Anal.** Calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{25}\text{BrN}_2\text{O}_5$: C, 62.04; H, 4.49; N, 4.99. Found: C, 61.82; H, 4.55; N, 5.10.



5-(4'-Bromobenzyloxy)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid [2-(5-methoxy-1-methyl-1H-indol-3-yl)-ethyl]-amide (25e). The crude was prepared according to general procedure D₁ starting from **3** (195 mg, 0.5 mmol) and **22b** (107 mg, 0.5 mmol) and precipitated in diethyl ether to afford **25e** as a white solid (108 mg, 37%). $\text{C}_{29}\text{H}_{25}\text{BrN}_2\text{O}_5$. **m.p.** 178–180°C.

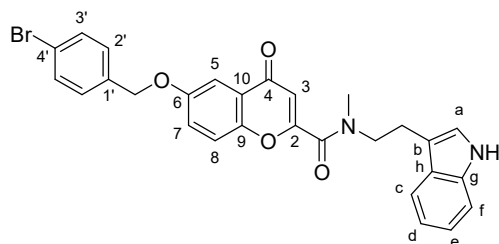
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.94 (t, 2H, *J* = 7.7 Hz, NHCH₂CH₂), 3.54 (q, 2H, *J* = 6.5 Hz, NHCH₂CH₂), 3.70 (s, 3H, NCH₃), 3.74 (s, 3H, OCH₃), 5.25 (s, 2H, OCH₂), 6.67 (s, 1H, *H*₃), 6.77 (dd, 1H, *J* = 2.4 Hz, *J* = 8.8 Hz, *H*_e), 7.08-7.12 (m, 5H, *H*₆, *H*₈, *H*_a, *H*_c, *H*_f), 7.60 (m, 4H, *H*₂', *H*₃'), 7.76 (t, 1H, *J* = 8.4 Hz, *H*₇), 9.19 (t, 1H, *J* = 5.8 Hz, NH). **¹³C NMR** (100 MHz, DMSO-d₆) δ 24.7 (NHCH₂CH₂), 32.4 (NCH₃), under peak of DMSO (NHCH₂CH₂), 55.3 (OCH₃), 69.2 (OCH₂), 100.4 (*C*_c), 110.4 and 110.6 and 111.1 and 112.1 (*C*₃, *C*₆, *C*₈, *C*_b, *C*_e, *C*_f), 114.5 (*C*₁₀), 120.6 (*C*₄'), 127.7 and 127.8 (*C*_a and *C*_h), 128.9 (*C*₂'), 131.2 (*C*₃'), 132.0 (*C*_g), 134.9 (*C*₇), 136.3 (*C*₁'), 153.1 and 153.6 (*C*₂ and *C*_d), 157.0 and 157.7 (*C*₅ and *C*₉), 158.9 (CO), 176.5 (*C*₄). **MS** (ESI) *m/z* 561 (⁷⁹Br), 463 (⁸¹Br) [M+H]⁺. **Anal.** Calcd for C₂₉H₂₅BrN₂O₅: C, 62.04; H, 4.49; N, 4.99. Found: C, 62.08; H, 4.74; N, 5.13.



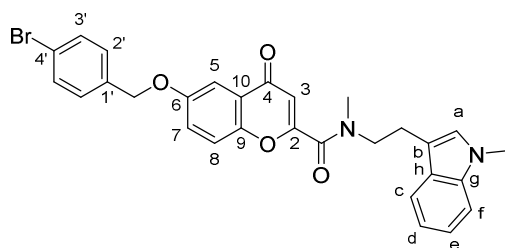
5-(4'-Bromobenzyloxy)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid [2-(5-methoxy-1-methyl-1H-indol-3-yl)-ethyl]-methyl-amide (25f). To a solution of **MBL-II-141** (220 mg, 0.4 mmol) in tetrahydrofuran (40ml) was added sodium hydride (50 mg, 1.2 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature for 20 min. Iodomethane (170 mg, 1.2 mmol) was added and the mixture was stirred at room temperature for 16h. The mixture was poured into 1M hydrochloric acid and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with water, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The solid was washed with diethyl ether and purified by flash silica column chromatography using petroleum ether/ethyl acetate (8:2 to 7:3) as eluent to afford **25f** as a yellowish solid (mixture of isomers (2:1)) (60 mg, 25%). C₃₀H₂₇BrN₂O₅. **m.p.** 69-72°C. **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ 2.96-3.17 (m, 5H, NCH₂CH₂, CONCH₃), 3.55-3.88 (m, 8H, NCH₂CH₂, OCH₃, indole NCH₃), 5.17 (s, 1.3H, OCH₂), 5.19 (s, 0.7H, OCH₂), 6.02 (s, 0.6H, *H*₃), 6.39 (s, 0.4H, *H*₃), 6.55-7.26 (m, 6H, *H*₆, *H*₈, *H*_a, *H*_c, *H*_e, *H*_f), 7.40-7.56 (m, 5H, *H*₂', *H*₃'), *H*₇). **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ 23.4, 32.2, 33.1, 50.8, 55.0, 55.4, 69.2, 99.4, 108.9, 109.1, 109.1, 110.2, 110.3, 110.4, 111.1, 111.9, 114.0, 120.5, 120.6, 127.2, 128.4, 128.9, 131.2, 131.8, 134.3, 136.5, 153.0, 155.4, 156.7, 157.2, 157.6, 158.8, 161.5, 175.3. **MS** (ESI) *m/z* 575

PARTIE EXPÉRIMENTALE

(^{79}Br), 577 (^{81}Br) $[\text{M}+\text{H}]^+$. **Anal. Calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{27}\text{BrN}_2\text{O}_5$:** C, 62.61; H, 4.74; N, 4.87. Found: C, 55.93; H, 4.40; N, 3.60.



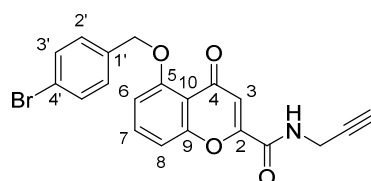
6-(4'-Bromobenzyloxy)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid [2-(1H-indol-3-yl)-ethyl]-methyl-amide (25g). The crude was prepared according to general procedure D₁ starting from **6a** (150 mg, 0.4 mmol) and **19a** (70 mg, 0.4 mmol) and was washed with petroleum ether to afford **25g** as a white solid (mixture of rotamers (6:4)) (89 mg, 42%). $\text{C}_{28}\text{H}_{23}\text{BrN}_2\text{O}_4$. **m.p.** 179–180°C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 2.97–3.06 (m, 5H, NCH_3 , NCH_2CH_2), 3.64–3.71 (m, 2H, NCH_2CH_2), 5.22 (s, 1.2H, OCH_2), 5.23 (s, 0.8H, OCH_2), 6.16 (s, 0.6H, H_3), 6.46 (s, 0.4H, H_3), 6.50–7.68 (m, 12H, H_6 , H_7 , H_8 , H_2 , H_3 , H_a , H_c , H_d , H_e , H_f), 10.80 (s, 0.6H, indole NH), 10.87 (s, 0.4H, indole NH). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ 23.6, 32.8, 50.9, 69.0, 106.1, 106.2, 109.2, 109.5, 110.0, 111.3, 111.4, 117.4, 118.0, 118.2, 118.3, 120.2, 120.3, 120.8, 123.0, 123.5, 124.0, 124.4, 126.6, 127.2, 129.8, 131.4, 136.1, 136.2, 149.8, 155.5, 157.9, 158.3, 161.3, 161.7, 176.0, 176.3. **MS** (ESI) m/z 531 (^{79}Br), 533 (^{81}Br) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 553 (^{79}Br), 555 (^{81}Br) $[\text{M}+\text{Na}]^+$. **Anal. Calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{23}\text{BrN}_2\text{O}_4$:** C, 63.29; H, 4.36; N, 5.27. Found: C, 62.34; H, 4.87; N, 5.24.



6-(4'-Bromobenzyloxy)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid [2-(1-methyl-1H-indol-3-yl)-ethyl]-methyl-amide (25h). The crude was prepared according to general procedure D₁ starting from **6a** (150 mg, 0.4 mmol) and **24** (75 mg, 0.4 mmol) and washed with diethyl ether to afford **25h** as a white solid (mixture of rotamers (3:2)) (80 mg, 37%). $\text{C}_{29}\text{H}_{25}\text{BrN}_2\text{O}_4$. **m.p.** 127–131°C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 2.95–3.10 (m, 2H, NCH_2CH_2), 3.06 (s, 1.1H,

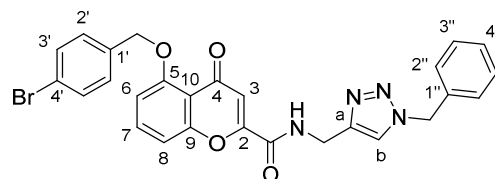
NCH₃), 3.08 (s, 1.9H, NCH₃), 3.65–3.75 (m, 5H, NCH₂CH₂, NCH₃), 5.22 (s, 0.8H, OCH₂), 5.23 (s, 1.2H, OCH₂), 6.03 (s, 0.7H, H₃), 6.47 (s, 0.3H, H₃), 6.86–7.70 (m, 12H, H₆, H₇, H₈, H₂', H₃', H_a, H_c, H_d, H_e, H_f). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 23.5, 32.1, 33.0, 51.0, 68.9, 106.2, 109.4, 109.5, 109.6, 117.7, 118.1, 118.4, 120.1, 120.3, 120.9, 121.0, 121.1, 123.9, 124.0, 126.9, 127.8, 129.8, 131.4, 136.1, 136.4, 136.6, 149.7, 150.3, 155.5, 155.8, 157.8, 158.3, 161.3, 161.6, 175.8, 176.3. **MS** (ESI) *m/z* 545 (⁷⁹Br), 547 (⁸¹Br) [M+H]⁺, 567 (⁷⁹Br), 569 (⁸¹Br) [M+Na]⁺. **Anal.** Calcd for C₂₉H₂₅BrN₂O₄: C, 63.86; H, 4.62; N, 5.14. Found: C, 63.60; H, 4.67; N, 5.37.

II.1.3.6 Introduction of a triazolic ring – Synthesis of compounds 27a to 27c



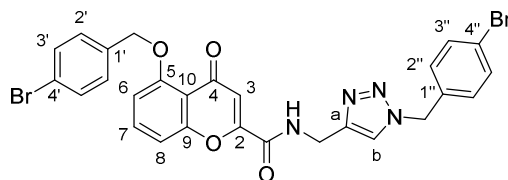
5-(4'-Bromobenzyloxy)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid prop-2-ynylamide (26).

The crude was prepared according to general procedure D₁ starting from propargylamine (73 mg, 1.3 mmol) and **3** (500 mg, 1.3 mmol) and was washed with diethyl ether to afford **26** as a white solid (240 mg, 40%). C₂₀H₁₄BrNO₄. **m.p.** 233–235°C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 3.20 (t, 1H, *J* = 2.4 Hz, CH₂C≡CH), 4.09 (dd, 2H, *J* = 2.4 Hz, *J* = 5.6 Hz, CH₂C≡CH), 5.23 (s, 2H, OCH₂), 6.67 (s, 1H, H₃), 7.10 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz, H₆ or H₈), 7.26 (dd, 1H, *J* = 0.8 Hz, *J* = 8.8 Hz, H₆ or H₈), 7.60 (m, 4H, H₂', H₃'), 7.75 (t, 1H, *J* = 8.4 Hz, H₇), 9.54 (t, 1H, *J* = 5.6 Hz, NH). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 30.7 (NHCH₂C≡CH), 69.2 (OCH₂), 73.5 (NHCH₂C≡CH), 80.3 (NHCH₂C≡CH), 108.9 and 110.6 (C₆ and C₈), 112.4 (C₃), 114.5 (C₁₀), 120.6 (C₄'), 128.9 (C₂'), 131.2 (C₃'), 135.1 (C₇), 136.3 (C₁'), 153.0 (C₂), 157.0 and 157.7 (C₅, C₉), 158.9 (CO), 206.6 (C₄). **MS** (ESI) *m/z* 412 (⁷⁹Br), 414 (⁸¹Br) [M+H]⁺.

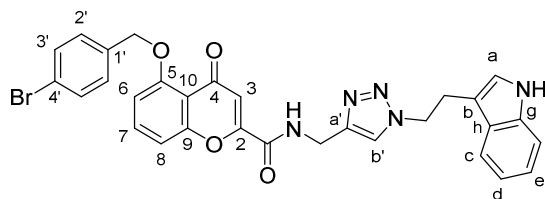


5-(4'-Bromobenzyloxy)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid [1-benzyl-1H(1,2,3)triazol-4-ylmethyl]-amide (27a). The crude was prepared according to general

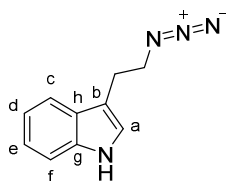
procedure I starting from **26** (75 mg, 0.2 mmol) and benzyl azide (29 mg, 0.2 mmol) and washed with diethyl ether to afford **27a** as a white solid (45 mg, 46%). $C_{27}H_{21}BrN_4O_4$. **m.p.** 202–205°C. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 4.53 (d, 2H, $J = 5.2$ Hz, CONHCH $_2$), 5.24 (s, 2H, OCH $_2$), 5.57 (s, 2H, NCH $_2$), 6.68 (s, 1H, H_3), 7.10 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, H_6 or H_8), 7.24 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, H_6 or H_8), 7.32–7.39 (m, 5H, $H_{2''}$, $H_{3''}$, $H_{4''}$), 7.60 (m, 4H, $H_{2'}$, $H_{3'}$), 7.77 (t, 1H, $J = 8.4$ Hz, H_7), 8.09 (s, 1H, H_b), 9.63 (t, 1H, $J = 5.8$ Hz, NH). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl $_3$) δ 35.0 (CONHCH $_2$), 54.7 (NCH $_2$), 70.3 (OCH $_2$), 109.0 and 110.7 (C_6 and C_8), 114.0 (C_3), 115.6 (C_{10}), 121.8 ($C_{4'}$), 128.4 ($C_{2''}$ and $C_{3''}$), 129.2 ($C_{4''}$ and C_b), 129.4 ($C_{2'}$), 131.8 ($C_{3'}$), 134.2, 134.6 and 135.4 (C_7 , $C_{1'}$, $C_{1''}$ and C_a), 152.6 (C_2), 157.4 and 158.6 (C_5 and C_9), 159.5 (CO), 177.6 (C_4). **MS** (ESI) m/z 567 (^{79}Br), 569 (^{81}Br) [$M+Na$] $^+$. **Anal.** Calcd for $C_{27}H_{21}BrN_4O_4$: C, 59.46; H, 3.88; N, 10.27. Found: C, 59.00; H, 3.91; N, 10.43.



5-(4'-Bromobenzyloxy)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid [1-(4''-bromobenzyl)-1H-(1,2,3)triazol-4-ylmethyl]-amide (27b). The crude was prepared according to general procedure I starting from **26** (210 mg, 0.5 mmol) and 4-bromobenzyl azide (1.2 ml, 0.6 mmol) and washed with diethyl ether to afford **27b** as a white solid (16 mg, 5%). $C_{27}H_{20}Br_2N_4O_4$. **m.p.** 211–214°C. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 4.51 (d, 2H, $J = 5.6$ Hz, CONHCH $_2$), 5.22 (s, 2H, OCH $_2$), 5.53 (s, 2H, NCH $_2$), 6.66 (s, 1H, H_3), 7.07 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, H_8), 7.22 (dd, 1H, $J = 0.4$ Hz, $J = 8.4$ Hz, H_6), 7.26 (m, 2H, $H_{2''}$), 7.53–7.61 (m, 6H, $H_{3''}$, $H_{2'}$, $H_{3'}$), 7.73 (t, 1H, $J = 8.4$ Hz, H_7), 8.08 (s, 1H, H_b), 9.60 (t, 1H, $J = 6$ Hz, CONH). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 34.7 (CONHCH $_2$), 52.0 (NCH $_2$), 69.2 (OCH $_2$), 108.9 and 110.6 (C_6 and C_8), 112.3 (C_3), 114.5 (C_{10}), 120.6 ($C_{4'}$), 121.4 ($C_{4''}$), 123.4 (C_b), 128.9 ($C_{2'}$), 130.2 ($C_{2''}$), 131.2 ($C_{3'}$), 131.6 ($C_{3''}$), 135.0 (C_7), 135.4 ($C_{1'}$), 136.3 ($C_{1''}$), 144.32 (C_a), 153.3 (C_2), 157.0 and 157.7 (C_5 and C_9), 159.0 (CO), 176.5 (C_4). **MS** (ESI) m/z 645 (^{79}Br), 647 (^{81}Br) [$M+Na$] $^+$. **Anal.** Calcd for $C_{27}H_{20}Br_2N_4O_4$: C, 51.95; H, 3.23; N, 8.97. Found: C, 51.81; H, 3.41; N, 9.89.



5-(4'-Bromobenzyloxy)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid [1-(2-(1H-indol-3-yl)-ethyl]-1H-(1,2,3)triazol-4-ylmethyl]-amide (27c). The crude was prepared according to general procedure I starting from **26** (360 mg, 0.9 mmol) and **28** (198 mg, 1 mmol) and was washed with diethyl ether to afford **27c** as a white solid (52 mg, 10%). $C_{30}H_{24}BrN_5O_4$. **m.p.** 169–171°C. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 3.25 (t, 2H, $J = 7.6$ Hz, NCH_2CH_2), 4.51 (d, 2H, $J = 6.0$ Hz, $CONHCH_2$), 4.60 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz, NCH_2CH_2), 5.24 (s, 2H, OCH_2), 6.68 (s, 1H, H_3), 6.93–7.05 (m, 2H, H_d and H_e), 7.09–7.50 (m, 4H, H_6 , H_8 , H_a , H_c and H_f), 7.60 (m, 4H, H_2 , H_3), 7.75 (t, 1H, $J = 8.4$ Hz, H_7), 8.04 (s, 1H, $H_{b'}$), 9.62 (t, 1H, $J = 5.6$ Hz, $CONH$), 10.85 (s, 1H, indole NH). ^{13}C NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 34.6 ($CONHCH_2$), under peak of DMSO (NCH_2CH_2), 50.0 (NCH_2CH_2), 69.1 (OCH_2), 108.8 (C_6 or C_8), 109.9 (C_f), 110.5 (C_6 or C_8), 111.3 (C_b), 112.2 (C_3), 114.4 (C_{10}), 118.0 and 118.2 (C_c and C_e), 120.5 (C_4), 120.9 (C_d), 123.0 and 123.1 (C_a and $C_{b'}$), 126.8 (C_h), 128.8 ($C_{2'}$), 131.1 ($C_{3'}$), 134.9 (C_7), 136.0 ($C_{1'}$), 136.2 (C_g), 143.8 ($C_{a'}$), 153.2 (C_2), 156.9 and 157.6 (C_5 and C_9), 158.9 (CO), 176.4 (C_4). **MS** (ESI) m/z 596 (^{79}Br), 598 (^{81}Br) [$M-H$] $^-$. **Anal.** Calcd for $C_{30}H_{24}BrN_5O_4$: C, 60.21; H, 4.04; N, 11.70. Found: C, 58.62; H, 4.32; N, 11.31.

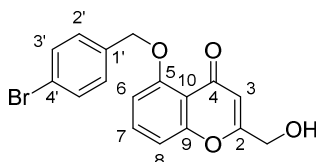


3-(2-azidoethyl)-1H-indole (28). To a solution of 3-(2-bromoethyl)-1H-indole (100 mg, 0.45 mmol) in DMF (5 ml) was added sodium azide (37 mg, 0.6 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature for 24h. The solution was poured into water and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with water, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to afford **28** as a brown oil (42 mg, 50%). $C_{10}H_{10}N_4$. 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 3.07 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz, $CH_2CH_2N_3$), 3.58 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz, $CH_2CH_2N_3$), 7.08 (s, 1H, H_a), 7.15 (t, 1H, $J = 8.0$ Hz, H_f), 7.22 (t, 1H, $J = 6.8$ Hz, H_c), 7.38 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H_d), 7.60 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H_e),

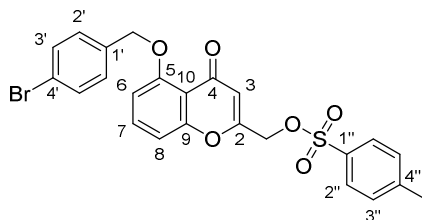
PARTIE EXPÉRIMENTALE

8.16 (s, 1H, NH). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 25.2 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$), 51.8 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$), 111.4 (C_f), 112.4 (C_b), 118.6 (C_c), 119.6 (C_d), 122.3 and 122.4 (C_a , and C_e), 127.2 (C_h), 136.4 (C_g). MS (ESI) m/z 185 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

II.1.3.7 Removal of central amide – Synthesis of compounds 31b and 32a



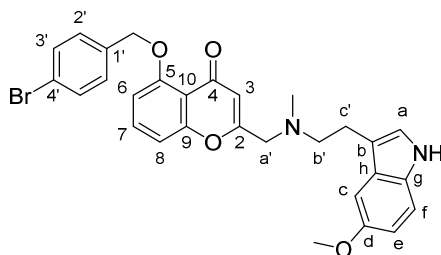
5-(4'-Bromobenzyloxy)-2-(hydroxymethyl)-4H-chromen-4-one (29). To a solution of **2** (500 mg, 1.2 mmol) in anhydrous methanol (25ml) was added sodium borohydride (171 mg, 4.5 mmol.). The resulting mixture was stirred at room temperature for 20 min. The solvent was removed and the residue was added to a solution of sodium dihydrogen phosphate hydrate (1.1 g in 30 ml of water) and extracted with chloroform. The combined organic layers were dried over anhydrous magnesium sulfate, concentrated under reduced pressure and washed with diethyl ether to afford **29** as a white solid (116 mg, 26%). $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{BrO}_4$. **m.p.** 144-146°C. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 4.37 (dd, 2H, $J = 0.8$ Hz, $J = 6.4$ Hz, CH_2OH), 5.22 (s, 2H, OCH_2), 5.74 (t, 1H, $J = 6.4$ Hz, OH), 6.17 (s, 1H, H_3), 7.03 (dd, 1H, $J = 0.4$ Hz, $J = 8.0$ Hz, H_6 or H_8), 7.11 (dd, 1H, $J = 0.8$ Hz, $J = 8.4$ Hz, H_6 or H_8), 7.58 (m, 4H, $H_{2'}$, $H_{3'}$), 7.65 (t, 1H, $J = 8.4$ Hz, H_7). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 59.4 (CH_2OH), 69.2 (OCH_2), 108.6 and 108.9 (C_6 and C_8), 110.2 (C_3), 114.2 (C_{10}), 120.5 ($\text{C}_{4'}$), 128.9 ($\text{C}_{2'}$), 131.2 ($\text{C}_{3'}$), 134.1 (C_7), 136.5 ($\text{C}_{1'}$), 157.6 and 157.7 (C_5 and C_9), 166.9 (C_2), 176.3 (C_4). MS (ESI) m/z 359 (^{79}Br), 361 (^{81}Br) $[\text{M}-\text{H}]^-$.



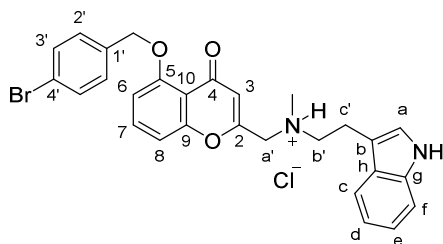
5-(4'-Bromobenzyloxy)-2-(tosyloxymethyl)-4H-chromen-4-one (30). To a solution of **29** (500 mg, 1.4 mmol) and triethylamine (448 mg, 4.4 mmol) in dichloromethane at 0°C was added dropwise a solution of tosylchloride (590 mg, 3.1 mmol) in dichloromethane. The

PARTIE EXPÉRIMENTALE

resulting mixture was stirred for 5 hours at room temperature, poured into 1M hydrochloric acid and extracted with dichloromethane. The combined organic layers were washed with sodium hydrogenocarbonate and water, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash silica column chromatography, using cyclohexane/acetone (9:1 to 8:2) as eluent to afford **30** as a white solid (322 mg, 45%). $C_{24}H_{19}BrO_6S$. **m.p.** 133–135°C. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.35 (s, 3H, CH_3), 5.14 (s, 2H, $SOCH_2$), 5.23 (s, 2H, OCH_2), 6.27 (s, 1H, H_3), 6.95 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz, H_6 or H_8), 7.04 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, H_6 or H_8), 7.41 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, $H_{2''}$), 7.58 (m, 4H, H_2 , $H_{3'}$), 7.66 (t, 1H, $J = 8.4$ Hz, H_7), 7.82 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, $H_{3''}$). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 21.0 (CH_3), 67.5 ($SOCH_2$), 69.2 (OCH_2), 108.9 and 110.1 (C_6 and C_8), 113.4 (C_{10}), 120.6 ($C_{4'}$), 125.5 (C_3 or $C_{1''}$), 127.9 ($C_{2''}$), 128.0 (C_3 or $C_{1''}$), 128.9 ($C_{2'}$), 130.1 ($C_{3''}$), 131.2 ($C_{3'}$), 134.6 (C_7), 136.3 ($C_{1'}$), 145.4 ($C_{4''}$), 157.4, 157.5 and 157.6 (C_2 , C_5 and C_9), 176.8 (C_4). **MS** (ESI) m/z 515 (^{79}Br), 517 (^{81}Br) [$M+H$] $^+$.

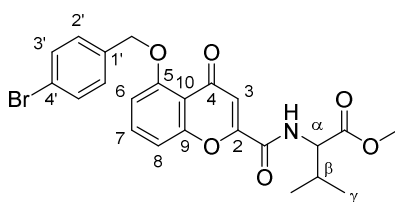


5-(4'-Bromobenzyloxy)-2-([2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)-ethyl]-methyl-amino)-methyl-chromen-4-one (31b). The crude was prepared according to the general procedure J starting from **30** (100 mg, 1.9 mmol) and **19b** (47 mg, 2.3 mmol) and was purified by flash silica column chromatography, using cyclohexane/acetone (9:1 to 7:3) as eluent to afford **31b** as a white solid (403 mg, 38%). $C_{29}H_{27}BrN_2O_4$. **m.p.** 64–67°C. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.39 (s, 3H, NCH_3), 2.66–2.75 (m, 2H, $H_{b'}$), 2.84–2.88 (m, 2H, $H_{c'}$), 3.58 (s, 2H, $H_{a'}$), 3.68 (s, 3H, OCH_3), 5.22 (s, 2H, OCH_2), 6.22 (s, 1H, H_3), 6.67–7.19 (m, 6H, H_6 , H_8 , H_a , H_c , H_e , H_f), 7.57–7.64 (m, 5H, H_7 , $H_{2'}$, $H_{3'}$), 10.60 (s, 1H, indole NH). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 22.8 ($C_{c'}$), 42.1 and 42.8 (NCH_3 and $C_{a'}$), 57.4 and 57.8 ($C_{b'}$ and OCH_3), 69.2 (OCH_2), 99.9 (C_c), 108.6 and 110.3 (C_6 and C_8), 110.9 and 117.7 (C_b and C_f), 111.9 (C_e and C_3), 114.2 (C_{10}), 120.5 ($C_{4'}$), 123.2 (C_a), 127.5 (C_h), 128.9 ($C_{2'}$), 131.2 ($C_{3'}$), 131.3 (C_g), 134.1 (C_7), 136.5 ($C_{1'}$), 152.9 (C_d), 157.7 and 157.8 (C_5 and C_9), 164.5 (C_2), 176.2 (C_4). **MS** (ESI) m/z 545 (^{79}Br), 547 (^{81}Br) [$M-H$] $^-$. **Anal.** Calcd for $C_{29}H_{27}BrN_2O_4$: C, 63.63; H, 4.97; N, 5.12. Found: C, 63.81; H, 5.00; N, 5.23.



5-(4'-Bromobenzyloxy)-2-([2-(1*H*-indol-3-yl)-ethyl]-methylamino)-methyl)-chromen-4-one hydrochloride (32a). The crude was prepared according to general procedure J starting from **30** (100 mg, 1.9 mmol) and **19a** (120 mg, 2.3 mmol) and was purified by flash silica column chromatography, using cyclohexane/acetone (9:1 to 7:3) and the chlorhydrate salt was form to afford **32a** as a white solid (333 mg, 31%). $C_{28}H_{26}BrClN_2O_3$. **m.p.** 158-160°C. 1H **NMR** (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.38 (s, 3H, NCH_3), 2.72–2.77 (m, 2H, $H_{b'}$), 2.87–2.91 (m, 2H, $H_{c'}$), 3.58 (s, 2H, $H_{a'}$), 5.22 (s, 2H, OCH_2), 6.20 (s, 1H, H_3), 6.92–7.48 (m, 7H, H_6 , H_8 , H_a , H_c , H_d , H_e , H_f), 7.57–7.66 (m, 5H, $H_{2'}$, $H_{3'}$, H_7), 10.81 (s, 1H, indole NH). ^{13}C **NMR** (100 MHz, DMSO- d_6) δ 15.1 ($C_{c'}$), 54.7 (NCH_3), 55.6 ($C_{b'}$), 64.9 ($C_{a'}$), 69.3 (OCH_2), 108.7 and 110.4 (C_6 and C_8), 111.6 (C_3), 112.0 (C_b and C_f), 114.2 (C_{10}), 118.3 and 118.5 (C_c and C_d), 120.6 ($C_{4'}$), 121.2 (C_e), 123.3 (C_a), 126.7 (C_h), 128.9 ($C_{2'}$), 131.2 ($C_{3'}$), 134.6 (C_7), 136.2 and 136.3 ($C_{1'}$ and C_g), no signal for C_2 , C_9 and C_g , 157.7 (C_5), 175.9 (C_4). **MS** (ESI) m/z 517 (^{79}Br), 519 (^{81}Br) $[M+H]^+$. **Anal.** Calcd for $C_{28}H_{26}BrClN_2O_3 \cdot 2H_2O$: C, 57.01; H, 5.12; N, 4.75. Found: C, 57.33; H, 5.1, N, 4.52.

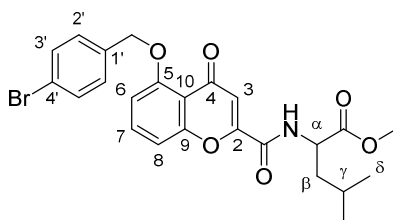
II.1.3.8 Introduction of an amino acid in the central chain – Synthesis of compounds **33a** to **35c**



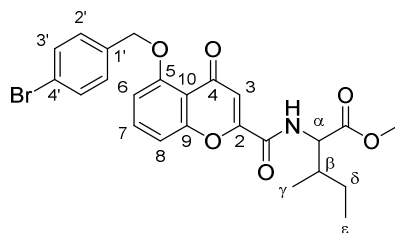
2-[(5-(4'-Bromobenzyloxy)4-oxo-4*H*-chromene-2-carbonyl)-amino]-3-methylbutyric acid methyl ester (33a). The crude was prepared according to general procedure D₂ starting from **3** (500 mg, 1.3 mmol) and L-valine methylester hydrochloride (446 mg, 2.7 mmol) and was washed with diethyl ether to afford **33a** as a white solid (540 mg, 83%). $C_{23}H_{22}BrNO_6$. **m.p.** 151-152°C. 1H **NMR** (400 MHz, DMSO- d_6) δ 0.96 (2d, 2×3H, J = 6.7 Hz, H_γ), 2.23 (m, 1H,

PARTIE EXPÉRIMENTALE

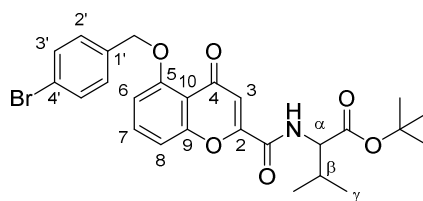
H_β), 3.69 (s, 3H, COOCH_3), 4.30 (t, 1H, $J = 7.8$ Hz, H_α), 5.25 (s, 2H, OCH_2), 6.70 (s, 1H, H_3), 7.11 (dd, 1H, $J = 0.7$ Hz, $J = 8.5$ Hz, H_6 or H_8), 7.34 (dd, 1H, $J = 0.7$ Hz, $J = 8.5$ Hz, H_6 or H_8), 7.61 (m, 4H, H_2 , H_3), 7.77 (t, 1H, $J = 8.4$ Hz, H_7), 9.16 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz, CONH). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ 19.0 and 19.1 (C_γ), 29.4 (C_β), 51.9 (COOCH_3), 58.5 (C_α), 69.2 (OCH_2), 109.0 (C_6 and C_8), 112.7 (C_3), 114.6 (C_{10}), 120.6 ($C_{4'}$), 129.0 ($C_{2'}$), 131.2 ($C_{3'}$), 134.9 (C_7), 136.3 ($C_{1'}$), 153.0 (C_2), 157.0 and 157.6 (C_5 and C_9), 159.7 (CONH), 171.3 (COOCH_3), 176.4 (C_4). MS (ESI) m/z 486 (^{79}Br), 488 (^{81}Br) $[\text{M-H}]^-$, 488 (^{79}Br), 490 (^{81}Br) $[\text{M+H}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{BrNO}_6$: C, 56.57; H, 4.54; N, 2.87. Found: C, 56.42; H, 4.49; N, 3.01.



2-[(5-(4'-Bromobenzyloxy)4-oxo-4H-chromene-2-carbonyl)-amino]-4-methylpentanoic acid methyl ester (33b). The crude was prepared according to general procedure D₂ starting from **3** (500 mg, 1.3 mmol) and L-leucine methylester hydrochloride (484 mg, 2.7 mmol) and was purified by flash silica column chromatography, using cyclohexane:acetone (8:2 to 5:5) as eluent to afford **33b** as a white solid (531 mg, 79%). $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{BrNO}_6$. m.p. 135-138°C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 0.90 (2d, 2×3H, $J = 5.6$ Hz, H_δ), 1.64 (m, 2H, H_β), 1.84 (t, 1H, $J = 9.6$ Hz, H_γ), 3.67 (s, 3H, COOCH_3), 4.54 (m, 1H, H_α), 5.25 (s, 2H, OCH_2), 6.70 (s, 1H, H_3), 7.11 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, H_6 or H_8), 7.30 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, H_6 or H_8), 7.61 (m, 4H, H_2 , H_3), 7.77 (t, 1H, $J = 8.4$ Hz, H_7), 9.33 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz, CONH). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ 21.1 and 22.8 (C_δ), 24.3 (C_β), one pic under DMSO (C_γ), 50.9 (C_α), 52.1 (COOCH_3), 69.2 (OCH_2), 109.0 and 110.7 (C_6 and C_8), 112.6 (C_3), 114.5 (C_{10}), 120.6 ($C_{4'}$), 128.9 ($C_{2'}$), 131.2 ($C_{3'}$), 135.0 (C_7), 136.3 ($C_{1'}$), 152.8 (C_2), 157.0 and 157.7 (C_5 and C_9), 159.4 (CONH), 172.1 (COOCH_3), 176.4 (C_4). MS (ESI) m/z 500 (^{79}Br), 502 (^{81}Br) $[\text{M-H}]^-$, 502 (^{79}Br), 504 (^{81}Br) $[\text{M+H}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{BrNO}_6$: C, 57.38; H, 4.82; N, 2.79. Found: C, 57.00; H, 5.12; N, 2.87.

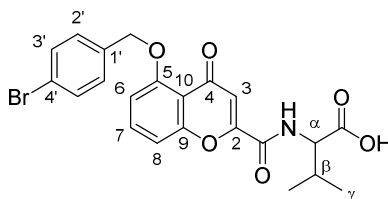


2-[(5-(4'-Bromobenzyloxy)-4-oxo-4*H*-chromene-2-carbonyl)-amino]-3-methylpentanoic acid methyl ester (33c). The crude was prepared according to general procedure D₂ starting from **3** (500 mg, 1.3 mmol) and L-Isoleucine methylester hydrochloride (484 mg, 2.7 mmol) and was recrystallized in acetonitrile to afford **33c** as a white solid (668 mg, 95%). C₂₄H₂₄BrNO₆. **m.p.** 159-160°C. **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 0.86-0.92 (m, 2×CH₃, *H*_γ, *H*_ε), 1.22-1.55 (m, 2H, *H*_δ), 1.99-2.06 (m, 1H, *H*_β), 3.68 (s, 3H, OCH₃), 4.37 (t, 1H, *J* = 7.2 Hz, *H*_α), 5.25 (s, 2H, OCH₂), 6.70 (s, 1H, *H*₃), 7.11 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, *H*₆ or *H*₈), 7.34 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz, *H*₆ or *H*₈), 7.61 (m, 4H, *H*_{2'}, *H*_{3'}), 7.77 (t, 1H, *J* = 8.4 Hz, *H*₇), 9.16 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz, CONH). **¹³C NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.8 and 15.4 (*C*_ε and *C*_γ), 25.1 (*C*_δ), 35.5 (*C*_β), 51.9 (OCH₃), 57.3 (*C*_α), 69.2 (OCH₂), 109.0 and 110.9 (*C*₆ and *C*₈), 112.8 (*C*₃), 114.6 (*C*₁₀), 120.6 (*C*_{4'}), 129.0 (*C*_{2'}), 131.3 (*C*_{3'}), 135.0 (*C*₇), 136.3 (*C*_{1'}), 153.0 (*C*₂), 157.1 and 157.7 (*C*₅ and *C*₉), 159.7 (CONH), 171.4 (COOH), 176.5 (*C*₄). **MS** (ESI) *m/z* 500 (⁷⁹Br), 502 (⁸¹Br) [M-H]⁻, 536 (⁷⁹Br), 538 (⁸¹Br) [M+Cl]⁻, 502 (⁷⁹Br), 504 (⁸¹Br) [M+H]⁺. **Anal. Calcd for C₂₄H₂₄BrNO₆:** C, 57.37; H, 4.82; N, 2.79. Found: C, 57.29; H, 5.01; N, 3.11.

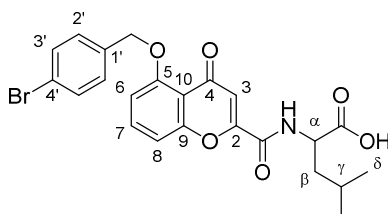


2-[(5-(4'-Bromobenzyloxy)-4-oxo-4*H*-chromene-2-carbonyl)-amino]-3-methylbutyric acid tert-butyl ester (33d). The crude was prepared according to general procedure D₂ starting from **3** (500 mg, 1.3 mmol) and L-valine tertbutylester hydrochloride (560 mg, 2.7 mmol) and was washed with diethyl ether to afford **33d** as a white solid (496 mg, 93%). C₂₆H₂₈BrNO₆. **m.p.** 176-177°C. **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 0.97 (2d, 2×3H, *J* = 7.2 Hz, *H*_γ), 1.44 (s, 9H, OC(CH₃)₃), 2.19-2.24 (m, 1H, *H*_β), 4.21 (t, 1H, *J* = 7.8 Hz, *H*_α), 5.25 (s, 2H, OCH₂), 6.70 (s, 1H, *H*₃), 7.11 (dd, 1H, *J* = 0.7 Hz, *J* = 8.5 Hz, *H*₆ or *H*₈), 7.34 (dd, 1H, *J* = 0.7 Hz, *J* = 8.5 Hz, *H*₆ or *H*₈), 7.61 (m, 4H, *H*_{2'}, *H*_{3'}), 7.77 (t, 1H, *J* = 8.4 Hz, *H*₇), 8.92 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz,

CONH). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 18.8 and 19.0 (C_γ), 27.7 (OC(CH $_3$) $_3$), 29.7 (C_β), 59.0 (C_α), 69.2 (OCH $_2$), 81.2 (OC(CH $_3$) $_3$), 109.0 and 110.9 (C_6 and C_8), 112.7 (C_3), 114.6 (C_{10}), 120.6 ($C_{4'}$), 129.0 ($C_{2'}$), 131.2 ($C_{3'}$), 134.9 (C_7), 136.3 ($C_{1'}$), 153.1 (C_2), 157.1 and 157.6 (C_5 and C_9), 159.6 (CONH), 169.9 (COO(CH $_3$) $_3$), 176.4 (C_4). MS (ESI) m/z 528 (^{79}Br), 530 (^{81}Br) [M-H] $^-$, 530 (^{79}Br), 532 (^{81}Br) [M+H] $^+$. Anal. Calcd for C $_{26}$ H $_{27}$ BrNO $_6$: C, 58.88; H, 5.32; N, 2.64. Found: C, 58.75; H, 5.55; N, 2.89.



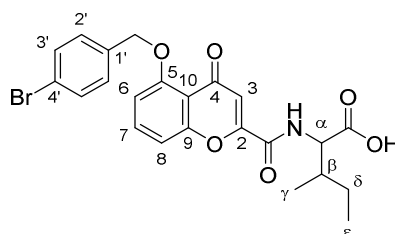
2-[(5-(4'-Bromobenzyloxy)4-oxo-4H-chromene-2-carbonyl)-amino]-3-methylbutyric acid (34a). The crude was prepared according to general procedure K starting from **33a** (400 mg, 0.8 mmol) and recrystallized in acetonitrile to afford **34a** as a white solid (282 mg, 72%). C $_{22}$ H $_{20}$ BrNO $_6$. m.p. 250-251°C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 0.97 (2d, 2 \times 3H, J = 6.4 Hz, H_γ), 2.24 (m, 1H, H_β), 4.25 (t, 1H, J = 7.1 Hz, H_α), 5.25 (s, 2H, OCH $_2$), 6.70 (s, 1H, H_3), 7.11 (d, 1H, J = 8.3 Hz, H_6 or H_8), 7.34 (d, 1H, J = 8.4 Hz, H_6 or H_8), 7.61 (m, 4H, $H_{2'}$, $H_{3'}$), 7.77 (t, 1H, J = 8.3 Hz, H_7), 8.89 (d, 1H, J = 7.8 Hz, CONH). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 19.0 and 19.5 (C_γ), 29.8 (C_β), 58.8 (C_α), 69.4 (OCH $_2$), 109.3 and 111.1 (C_6 and C_8), 112.8 (C_3), 114.7 (C_{10}), 120.9 ($C_{4'}$), 129.2 ($C_{2'}$), 131.5 ($C_{3'}$), 135.3 (C_7), 136.5 ($C_{1'}$), 153.5 (C_2), 157.3 and 157.8 (C_5 and C_9), 159.7 (CONH), 172.5 (COOH), 176.9 (C_4). MS (ESI) m/z 472 (^{79}Br), 474 (^{81}Br) [M-H] $^-$, 496 (^{79}Br), 498 (^{81}Br) [M+Na] $^+$. Anal. Calcd for C $_{22}$ H $_{20}$ BrNO $_6$: C, 55.70; H, 4.26; N, 2.95. Found: C, 55.54; H, 4.16; N, 3.06.



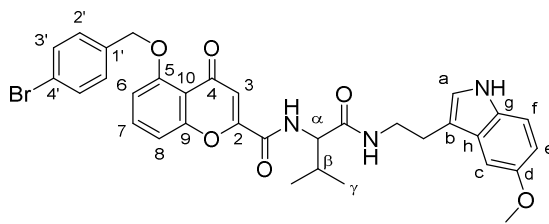
2-[(5-(4'-Bromobenzyloxy)4-oxo-4H-chromene-2-carbonyl)-amino]-3-methylpentanoic acid (34b). The crude was prepared according to general procedure starting from **33b** (450 mg, 0.9 mmol) and recrystallized in acetonitrile to afford **34b** as a white solid (163 mg, 37%). C $_{23}$ H $_{22}$ BrNO $_6$. m.p. 258-259°C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 0.90 (2d, 2 \times 3H, J = 6.2

PARTIE EXPÉRIMENTALE

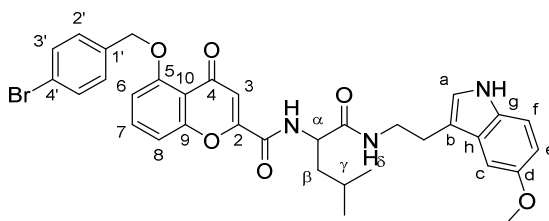
Hz, H_δ), 1.65 (m, 2H, H_β), 1.82 (m, 1H, H_γ), 4.45 (m, 1H, H_α), 5.25 (s, 2H, OCH_2), 6.70 (s, 1H, H_3), 7.11 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H_6 or H_8), 7.30 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, H_6 or H_8), 7.61 (m, 4H, $H_{2'}$, $H_{3'}$), 7.77 (t, 1H, $J = 8.4$ Hz, H_7), 9.33 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz, CONH). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 21.3 and 23.1 (C_δ), 24.6 (C_β), one pic under DMSO (C_γ), 51.1 (C_α), 69.4 (OCH_2), 109.2 and 111.0 (C_6 and C_8), 112.7 (C_3), 114.7 (C_{10}), 120.8 ($C_{4'}$), 129.2 ($C_{2'}$), 131.4 ($C_{3'}$), 135.2 (C_7), 136.5 ($C_{1'}$), 153.3 (C_2), 157.2 and 157.9 (C_5 and C_9), 159.5 (CONH), 173.4 (COOH), 176.7 (C_4). MS (ESI) m/z 486 (^{79}Br), 488 (^{81}Br) $[\text{M}-\text{H}]^-$, 488 (^{79}Br), 490 (^{81}Br) $[\text{M}+\text{H}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{BrNO}_6$: C, 56.57; H, 4.54; N, 2.87. Found: C, 56.54; H, 4.65; N, 3.06.



2-[(5-(4'-Bromobenzyloxy)-4-oxo-4H-chromene-2-carbonyl)-amino]-3-methylpentanoic acid (34c). The crude was prepared according to general procedure C starting from **33c** (300 mg, 0.6 mmol) and was purified by flash silica column chromatography using dichloromethane:methanol (95:5 to 8:2) as eluent to afford **34c** as a white solid (94 mg, 32%). $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{BrNO}_6$. m.p. 236-237°C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 0.88 (t, 3H, $J = 6.8$ Hz, H_ϵ), 0.93 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz, H_γ), 1.23-1.55 (m, 2H, H_δ), 1.98 (m, 1H, H_β), 4.31 (t, 1H, $J = 7.2$ Hz, H_α), 5.24 (s, 2H, OCH_2), 6.70 (s, 1H, H_3), 7.11 (d, 1H, $J = 8.04$ Hz, H_6 or H_8), 7.34 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, H_6 or H_8), 7.61 (m, 4H, $H_{2'}$, $H_{3'}$), 7.77 (t, 1H, $J = 8.4$ Hz, H_7), 8.92 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz, CONH). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 11.0 (C_ϵ), 15.6 (C_γ), 25.1 (C_δ), 35.9 (C_β), 57.3 (C_α), 69.2 (OCH_2), 109.0 and 110.9 (C_6 and C_8), 112.6 (C_3), 114.5 (C_{10}), 120.6 ($C_{4'}$), 128.9 ($C_{2'}$), 131.2 ($C_{3'}$), 134.9 (C_7), 136.3 ($C_{1'}$), 153.3 (C_2), 157.1 and 157.7 (C_5 and C_9), 159.4 (CONH), 172.2 (COOH), 176.5 (C_4). MS (ESI) m/z 486 (^{79}Br), 488 (^{81}Br) $[\text{M}-\text{H}]^-$, 510 (^{79}Br), 512 (^{81}Br) $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{BrNO}_6$: C, 56.56; H, 4.55; N, 2.87. Found: C, 56.11; H, 4.42; N, 2.95.



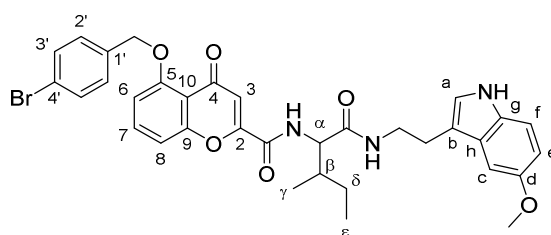
5-(4'-Bromobenzyloxy)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid {1-[2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)-ethylcarbamoyl]-2-methylpropyl}-amide (35a). The crude was prepared according to general procedure D₂ starting from **34a** (263 mg, 0.55 mmol) and 5-methoxytryptamine hydrochloride (211 mg, 1.1 mmol) and was purified by flash silica column chromatography using cyclohexane/acetone (8:2 to 5:5) as eluent to afford **35a** as a white solid (62.5 mg, 18%). C₃₃H₃₂BrN₃O₆. **m.p.** 170-171°C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 0.90 (d, 2×3H, *J* = 6.7 Hz, *H*_γ), 2.14 (m, 1H, *H*_β), 2.81 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, NHCH₂CH₂), 3.42 (m, 2H, NHCH₂CH₂), 3.75 (s, 3H, OCH₃), 4.26 (t, 1H, *J* = 8.3 Hz, *H*_a), 5.25 (s, 2H, OCH₂), 6.69 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz, *H*_e), 6.70 (s, 1H, *H*₃), 7.01 (d, 1H, *J* = 2.3 Hz, *H*_c), 7.10-7.12 (m, 2H, *H*₆ or *H*₈, *H*_a), 7.20 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, *H*_f) 7.35 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, *H*₆ or *H*₈), 7.61 (m, 4H, *H*_{2'}, *H*_{3'}), 7.77 (t, 1H, *J* = 8.4 Hz, *H*₇), 8.32 (t, 1H, *J* = 5.6 Hz, CONHCH₂CH₂), 8.77 (d, 1H, *J* = 4.8 Hz, CONHCHC), 10.64 (s, 1H, indole NH). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 19.2 and 19.6 (*C*_γ), 25.4 (NHCH₂CH₂), 30.7 (*C*_β), under peak of DMSO (NHCH₂CH₂), 55.9 (OCH₃), 59.8 (*C*_a), 69.8 (OCH₂), 100.6 (*C*_c), 109.9 and 111.4 (*C*₆ and *C*₈), 111.6 and 111.8 (*C*_b and *C*_f), 112.6 and 113.0 (*C*_e and *C*₃), 114.9 (*C*₁₀), 121.2 (*C*_{4'}), 124.0 (*C*_a), 127.9 (*C*_h), 129.6 (*C*_{2'}), 131.8 (*C*_{3'}), 131.9 (*C*_g), 135.7 (*C*₇), 136.6 (*C*_{1'}), 153.5 and 153.8 (*C*₂ and *C*_d), 157.5 and 158.1 (*C*₅ and *C*₉), 159.7 (CONHCHC), 170.9 (CONHCH₂CH₂), 177.6 (*C*₄). **MS** (ESI) *m/z* 644 (⁷⁹Br), 646 (⁸¹Br) [M-H]⁻, 646 (⁷⁹Br), 648 (⁸¹Br) [M+H]⁺. **Anal.** Calcd for C₃₃H₃₂BrN₃O₆: C, 61.31; H, 4.99; N, 6.50. Found: C, 61.27; H, 5.48; N, 5.81.



5-(4'-Bromobenzyloxy)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid {1-[2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)-ethylcarbamoyl]-3-methylbutyl}-amide (35b). The crude was prepared according to general procedure D₂ starting from **34b** (163 mg, 0.3 mmol) and 5-

PARTIE EXPÉRIMENTALE

methoxytryptamine hydrochloride (127 mg, 0.7 mmol) and was washed with diethyl ether to afford **35b** as a white solid (64 mg, 29%). $C_{34}H_{34}BrN_3O_6$. **m.p.** 130-131°C. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 0.88 (2d, $2\times 3H$, $J = 6.2$ Hz, H_δ), 1.54-1.73 (m, 3H, H_γ , H_β), 2.79 (t, 2H, $J = 7.4$ Hz, $NHCH_2CH_2$), 3.39 (m, 2H, $NHCH_2CH_2$), 3.75 (s, 3H, OCH_3), 4.46-4.50 (m, 1H, H_a), 5.25 (s, 2H, OCH_2), 6.69-6.71 (m, 2H, H_3 , H_e), 7.01 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz, H_c), 7.09-7.12 (m, 2H, H_6 or H_8 , H_a), 7.20 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz, H_f), 7.34 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz, H_6 or H_8), 7.61 (m, 4H, $H_{2'}$, $H_{3'}$), 7.77 (t, 1H, $J = 8.4$ Hz, H_7), 8.21 (t, 1H, $J = 5.4$ Hz, $CONHCH_2CH_2$), 9.00 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, $CONHCHC$), 10.63 (s, 1H, indole NH). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 21.4 and 23.0 (C_δ), 24.4 ($NHCH_2CH_2$), 30.72 (C_β), under peak of DMSO ($NHCH_2CH_2$, C_γ), 51.9 (C_a), 55.4 (OCH_3), 69.2 (OCH_2), 100.1 (C_c), 109.0 and 110.9 (C_6 and C_8), 111.0 and 111.4 (C_b and C_f), 112.0 and 112.5 (C_e and C_3), 114.6 (C_{10}), 120.6 ($C_{4'}$), 123.4 (C_a), 127.5 (C_h), 129.0 ($C_{2'}$), 131.3 ($C_{3'}$), 131.4 (C_g), 135.0 (C_7), 136.3 ($C_{1'}$), 153.0 and 153.3 (C_2 and C_d), 157.1 and 157.7 (C_5 and C_9), 159.1 ($CONHCHC$), 171.1 ($CONHCH_2CH_2$), 176.6 (C_4). **MS** (ESI) m/z 658 (^{79}Br), 660 (^{81}Br) $[M-H]^-$, 660 (^{79}Br), 662 (^{81}Br) $[M+H]^+$. **Anal.** Calcd for $C_{34}H_{34}BrN_3O_6$: C, 61.81; H, 5.20; N, 6.36. Found: C, 60.49; H, 5.22; N, 6.16.



5-(4'-Bromobenzyloxy)-4-oxo-4H-chromene-2-carboxylic acid {1-[2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)-ethylcarbamoyl]-2-methylbutyl}-amide (35c). The crude was prepared according to general procedure D₂ starting from **34c** (151.5 mg, 0.3 mmol) and 5-methoxytryptamine hydrochloride (118 mg, 0.6 mmol) and was purified by flash silica column chromatography using cyclohexane:ethyl acetate (9:1 to 5:5) as eluent to afford **35c** as a white solid (14 mg, 7%). $C_{34}H_{34}BrN_3O_6$. **m.p.** 117-119°C. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 0.81-0.88 (m, $2\times CH_3$, H_γ , H_ϵ), 1.07-1.49 (m, 2H, H_δ), 1.94 (m, 1H, H_β), 2.80 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz, $NHCH_2CH_2$), under peak of H_2O (2H, $NHCH_2CH_2$), 3.75 (s, 3H, OCH_3), 4.29-4.44 (m, 1H, H_a), 5.24 (s, 2H, OCH_2), 6.68-6.71 (m, 2H, H_3 , H_e), 7.01 (d, 1H, $J = 2.3$ Hz, H_c), 7.10-7.12 (m, 2H, H_6 or H_8 , H_a), 7.20 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz, H_f), 7.35 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz, H_6 or H_8), 7.61 (m, 4H, $H_{2'}$, $H_{3'}$), 7.76 (t, 1H, $J = 8.4$ Hz, H_7), 8.30 (m, 1H, $CONHCH_2CH_2$), 8.70 (m, 1H, $CONHCHC$), 10.63 (s, 1H, indole NH). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 10.7 (C_ϵ),

14.7 (C_γ), 25.1 (NHCH_2CH_2), 25.7 (C_δ), under peak of DMSO (NHCH_2CH_2 , C_β), 55.3 (OCH_3), 57.1 (C_a), 69.2 (OCH_2), 99.2 (C_c), 100.1 and 109.0 (C_6 and C_8), 110.9 and 111.4 (C_b and C_f), 112.0 and 112.6 (C_e and C_3), 114.5 (C_{10}), no signal for C_4 , 123.4 (C_a), 127.5 (C_h), 129.0 ($C_{2'}$), 131.3 ($C_{3'}$), 131.4 (C_g), 135.0 (C_7), 136.4 ($C_{1'}$), 152.9 and 153.3 (C_2 and C_d), 157.1 and 157.7 (C_5 and C_9), 159.0 (CONHCHC), 170.1 ($\text{CONHCH}_2\text{CH}_2$), 176.5 (C_4). **MS** (ESI) m/z 660 (^{79}Br), 662 (^{81}Br) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 682 (^{79}Br), 684 (^{81}Br) $[\text{M}+\text{Na}]^+$. **Anal. Calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{34}\text{BrN}_3\text{O}_6$:** C, 61.81; H, 5.20; N, 6.36. Found: C, 61.31; H, 5.26; N, 6.47.

II.2. SYNTHESIS OF MRP1 DERIVATIVES

II.2.1. Synthesis of flavonoid dimers

II.2.1.1 General procedures

General procedure L. To a solution of acetophenone (1 equiv.) in tetrahydrofuran (5 mL/mmol) was added sodium hydride (60%, 4 equiv.). The resulting mixture was stirred at 25°C for 30 min. Then a solution of *O*-alkylated benzaldehyde (0.9 equiv.) in tetrahydrofuran (5 mL/mmol) was added dropwise. The resulting solution was stirred at 25°C under argon for 2 h. The mixture was poured into 1M hydrochloric acid and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with water, dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure.

General procedure M. To a solution of chalcone (1 equiv.) in a minimum amount of dimethyl sulfoxide heated at 50°C was added diiodo (cat.). The resulting mixture was stirred at 140°C for 4 h. The solution was cooled to 25°C, poured into water and extracted with dichloromethane. The combined organic layers were washed with a solution of sodium thiosulfate (0.1%), dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure.

General procedure N. To a solution of alkylated flavone (1 equiv.) and potassium carbonate (4 equiv.) in methanol (20 mL/mmol) was added dropwise palladium tetrakis(triphenylphosphine)(0) (cat.). The resulting mixture was refluxed for 2 h 30. The

PARTIE EXPÉRIMENTALE

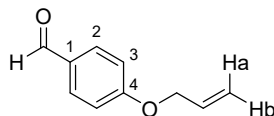
solution was cooled to 25 °C, poured into water and acidified to pH 4-5 with 1M hydrochloric acid at 0°C. The white formed precipitate was filtrated and washed with diethyl ether.

General procedure O. A solution of sodium hydroxide (3.5 equiv.) in water (2.5 mL/mmol) was added at 0°C to a solution of ethylene glycol derivative (1 equiv.) in tetrahydrofuran (2.5 mL/mmol). A solution of *p*-toluenesulfonylchloride (2.2 equiv.) in tetrahydrofuran (4 mL/mmol) was added dropwise for 30 min. The resulting mixture was stirred at 0°C for 3 h. The mixture was poured in a cold solution of 1M hydrochloric acid and extracted with dichloromethane. The combined organic layers were washed with a saturated solution of sodium hydrogenocarbonate and water, dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure.

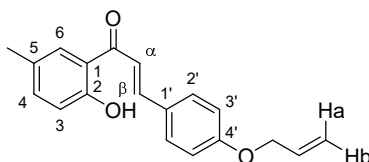
General procedure P. To a solution of dibenzaldehyde (1 equiv.) and acetophenone derivative (4 equiv.) in 96% ethanol (15 mL/mmol) was added dropwise a solution of 50% potassium hydroxide in water (2 mL/mmol). The resulting mixture was stirred at 90°C for 5 h and stirred at 25°C for 20 h. The mixture was poured into 1M hydrochloric acid and stirred a couple of hours to form a yellow solid. The solid was filtered, dried at 106°C for 1 h and washed with diethyl ether for 1 h to eliminate the excess of starting acetophenone. The solid was filtrated and dried at 100°C overnight. Because some traces of starting dibenzaldehyde were detected, the dried solid was washed with a solution of ethyl acetate, acetone and ethanol (1/1/1) for 1 h, filtered and dried in oven overnight.

General procedure Q. 4-Hydroxybenzaldehyde (1 equiv.) was dissolved with potassium carbonate (6 equiv.) and tetrabutylammonium bromide (cat.) in dry *N, N*-dimethylformamide (5 mL/mmol). The mixture was heated to 80°C under argon. A solution of the tosylate derivative (0.5 equiv.) in *N, N*-dimethylformamide (5 mL/mmol) was added dropwise and the resulting mixture was stirred at 80°C under argon for 3 h-4 h. The mixture was cooled to 25°C and poured into cold water to form a white solid. This solid was filtered, washed with water and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure.

II.2.1.2 Synthesis of dimer 4e

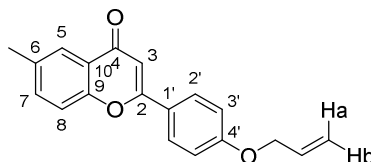


4-Allyloxybenzaldehyde (36). In a round bottom flask were dissolved allylbromide (1.2 g, 9.8 mmol), potassium carbonate (3.4 g, 24.6 mmol) and tetrabutylammonium bromide (cat) in acetone (15 ml). Then was added dropwise a solution of 4-hydroxybenzaldehyde (1 g, 8.2 mmol) in acetone (15 ml). The resulting mixture was stirred at room temperature for 30 min and then was refluxed for 3h30. The resulting mixture was poured into 1M hydrochloric acid and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with water, dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude oil was purified by flash silica column chromatography using cyclohexane:ethyl acetate (95:5) as eluent to afford **36** as a yellow oil (876 mg, 67%). $C_{10}H_{10}O_2$. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 4.62 (d, 2H, $J = 5.2$ Hz, OCH_2CHCH_2), 5.33 (dd, 1H, $J = 1.0$ Hz, $J = 10.5$ Hz, H_b), 5.43 (dd, 1H, $J = 1.0$ Hz, $J = 17.2$ Hz, H_a), 6.07 (m, 1H, OCH_2CHCH_2), 7.01 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, H_3), 7.82 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, H_2), 9.88 (s, 1H, CHO). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 69.0 (OCH_2CHCH_2), 115.0 (C_3), 118.4 (OCH_2CHCH_2), 130.1 (C_1), 132.0 (C_2), 132.3 (OCH_2CHCH_2), 163.6 (C_4), 190.8 (CHO). MS (ESI) m/z 163 $[M+H]^+$.

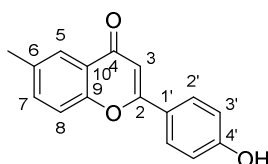


(E)-3-(4'-Allyloxyphenyl)-1-(2-hydroxy-5-methylphenyl)-prop-2-en-1-one (37). The crude was prepared according to general procedure L starting from **36** (2.5 g, 15.7 mmol) and 2-hydroxy-5-methylacetophenone (2.3 g, 15.7 mmol) and was washed with diethyl ether to afford **37** as a yellow solid (2.4 g, 52%). $C_{19}H_{18}O_3$. m.p. 79-80°C. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 2.36 (s, 3H, CH_3), 4.61 (d, 2H, $J = 5.3$ Hz, OCH_2CHCH_2), 5.33 (dd, 1H, $J = 1.3$ Hz, $J = 10.5$ Hz, H_b), 5.44 (dd, 1H, $J = 1.4$ Hz, $J = 17.2$ Hz, H_a), 6.07 (m, 1H, OCH_2CHCH_2), 6.93 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, H_3), 6.97 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz, $H_{3'}$), 7.30 (dd, 1H, $J = 1.9$ Hz, $J = 8.5$ Hz, H_4), 7.54 (d, 1H, $J = 15.4$ Hz, H_a), 7.63 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz, $H_{2'}$), 7.68 (s, 1H, H_6), 7.88 (d, 1H, $J = 15.4$ Hz, H_β), 12.74 (s, 1H, OH). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 20.8 (CH_3), 69.1

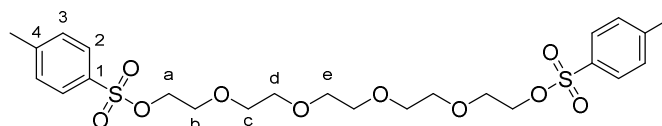
(OCH₂CHCH₂), 115.4 (C_{3'}), 118.0 (C_α), 118.3 (OCH₂CHCH₂), 118.5 (C₃), 119.9 (C₁), 127.7 (C_{1'}), 127.9 (C₅), 129.4 (C₆), 130.7 (C_{2'}), 132.8 (OCH₂CHCH₂), 137.4 (C₄), 145.2 (C_β), 161.1 (C_{4'}), 161.6 (C₂), 193.7 (CO). **MS** (ESI) *m/z* 295 [M+H]⁺, 293 [M-H]⁻.



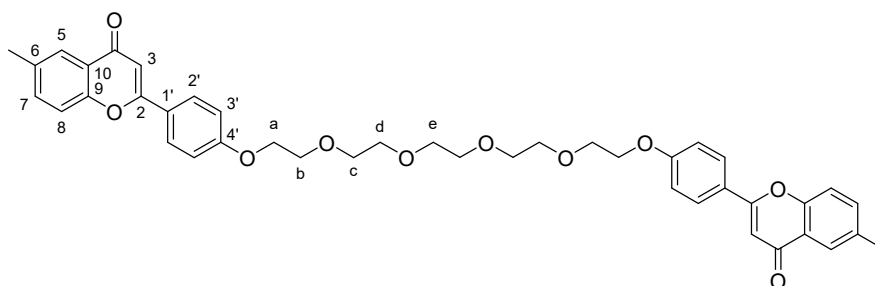
2-(4-Allyloxyphenyl)-6-methylchromen-4-one (38). The crude was prepared according to general procedure M starting from **37** (992 mg, 3.4 mmol) and was purified by flash silica column chromatography using cyclohexane: ethyl acetate (9:1) as eluent to afford **38** as a yellow solid (790 mg, 34%). C₁₉H₁₆O₃. **m.p.** 105-106°C. **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.43 (s, 3H, CH₃), 4.63 (m, 2H, OCH₂CHCH₂), 5.35 (m, 2H, OCH₂CHCH₂), 6.07 (m, 1H, OCH₂CHCH₂), 6.92 (s, 1H, H₃), 7.14 (m, 2H, H_{3'}), 7.64-7.69 (m, 2H, H₇, H₈), 7.83 (s, 1H, H₅), 8.05 (m, 2H, H_{2'}). **¹³C NMR** (100 MHz, DMSO-d₆) δ 20.4 (CH₃), 68.4 (OCH₂CHCH₂), 105.3 (C₃), 115.2 (C_{3'}), 117.8 (OCH₂CHCH₂), 118.2 (C₈), 123.0 and 123.4 (C₁₀ and C_{1'}), 124.0 (C₅), 128.1 (C_{2'}), 133.2 (OCH₂CHCH₂), 134.8 and 135.0 (C₆ and C₇), 153.9 (C₂), 161.0 and 162.4 (C₂ and C_{4'}), 176.9 (CO). **MS** (ESI) *m/z* 293 [M+H]⁺.



2-(4-Hydroxyphenyl)-6-methylchromen-4-one (39). The crude was prepared according to general procedure N starting from **38** (384 mg, 1.3 mmol) to afford **39** as a white solid (331 mg, 95%). C₁₆H₁₂O₃. **m.p.** 216 -218°C. **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-d₆) δ 2.43 (s, 3H, CH₃), 6.84 (s, 1H, H₃), 6.92-6.94 (m, 2H, H_{3'}), 7.63-7.64 (m, 2H, H₇, H₈), 7.82 (s, 1H, H₅), 7.94-7.96 (m, 2H, H_{2'}). **¹³C NMR** (100 MHz, DMSO-d₆) δ 20.4 (CH₃), 104.7 (C₃), 115.9 (C_{3'}), 118.1 (C₈), 121.7 and 123.0 (C_{1'} and C₁₀), 124.1 (C₅), 128.3 (C_{2'}), 134.8 and 135.0 (C₆ and C₇), 153.8 (C₂), 160.9 and 162.9 (C₂ and C_{4'}), 176.8 (CO). **MS** (ESI) *m/z* 253 [M+H]⁺, 251 [M-H]⁻.



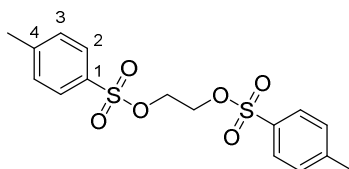
Toluene-4-sulfonic acid -2(2-{2-[2-(2-toluenesulfonyloxy-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-ethoxy) ethyl ester (40). The crude was prepared according to general procedure O starting from pentaethylene glycol (1 g, 4.2 mmol) to afford **40** as a yellow oil (2.2 g, 98%). $C_{24}H_{34}O_{10}S_2$. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 2.44 (s, 6H, CH_3), 3.57-3.74 (m, 16H, CH_2), 4.13-4.16 (m, 4H, CH_2), 7.32 (d, 4H, $J = 8.0$ Hz, H_3), 7.78 (d, 4H, $J = 8.3$ Hz, H_2). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 21.7 (CH_3), 68.8 (CH_2), 69.4 (CH_2), 70.6 (CH_2), 70.7 (CH_2), 70.8 (CH_2), 128.1 (C_2), 129.9 (C_3), 133.1 (C_1), 144.9 (C_4). MS (ESI) m/z 547 $[M+H]^+$.



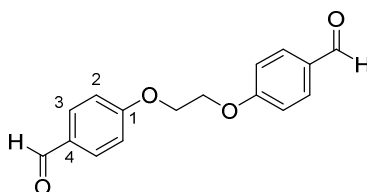
6-Methyl-2-[4-(2-{2-[2-(2-{2-[6-methyl-4-(4-oxo-4H-chromen-2-yl)-phenyloxy]-ethoxy}-ethoxy)-ethoxy]-ethoxy)-phenyl]-chromen-4-one (dimer 4e). To a solution of **39** (331 mg, 1.3 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (10 mL) were added potassium carbonate (452 mg, 3.3 mmol), tetrabutylammonium bromide (cat) and a solution of **40** (450 mg, 0.7 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (10 mL). The mixture was stirred at 100°C for 4h. The mixture was cooled to 25°C, poured into water and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with water, dried over magnesium sulfate, filtered, concentrated under reduced pressure and was purified by flash silica column chromatography using dichloromethane:methanol (99:1 to 97:3) as eluent to afford **dimer 4e** as a yellowish solid (135 mg, 14%). $C_{42}H_{42}O_{10}$. **m.p** 109-110°C. 1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ 2.40 (s, 6H, CH_3), 3.52-3.60 (m, 12H, CH_2), 3.75-3.77 (m, 4H, CH_2), 3.16-3.18 (m, 4H, CH_2), 6.86 (s, 2H, H_3), 7.08 (m, 4H, $H_{3'}$), 7.57-7.63 (m, 4H, H_7 , H_8), 7.78 (s, 2H, H_5), 7.98-8.00 (m, 4H, $H_{2'}$). ^{13}C NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$) δ 20.4 (CH_3), 67.5 (CH_2), 68.7 (CH_2), 69.8 (CH_2), 69.9 (CH_2), 105.2 (C_3), 114.9 ($C_{3'}$), 118.1 (C_8), 122.9 and 123.3 (C_{10} and $C_{1'}$), 124.0 (C_5), 128.0 ($C_{2'}$), 134.8 and 135.0 (C_6 and C_7), 153.8 (C_2), 161.3 and 162.3 (C_2 and $C_{4'}$), 176.8

(CO). **MS** (ESI) m/z 707 $[M+H]^+$. **Anal.** Calcd for **C₄₂H₄₂O₁₀**: C, 71.36; H, 6.00. Found: C, 71.24; H, 5.97.

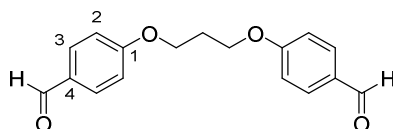
II.2.1.3 Synthesis of compounds 44a and 44b



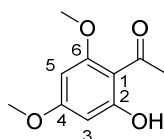
***p*-Toluenesulfonic acid-2-(*p*-toluenesulfonyloxy)-ethylester (41).** The crude was prepared according to general procedure O starting from ethylene glycol (1 g, 16.1 mmol) to afford **41** as a white solid (4.9 g, 83%). **C₁₆H₁₈O₆S₂**. **m.p.** 119-127°C. **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ 2.46 (s, 6H, CH₃), 4.18 (s, 4H, CH₂CH₂), 7.34 (d, 4H, J = 8.8 Hz, H_3), 7.73 (d, 4H, J = 8.8 Hz, H_2). **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ 21.4 (CH₃), 66.5 (CH₂CH₂), 127.7 (C_2), 129.7 (C_3), 132.1 (C_1), 145.0 (C_4). **MS** (ESI) m/z 393 $[M+Na]^+$.



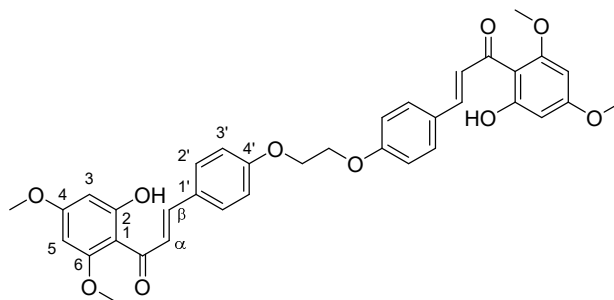
4-(2-(4-Formylphenoxy)ethoxy)benzaldehyde (42a). The crude was prepared according to general procedure Q starting from 4-hydroxybenzaldehyde (720 mg, 5.9 mmol) and **41** (1 g, 2.7 mmol) to afford **42a** as a white solid (630 mg, 86%). **C₁₆H₁₄O₄**. **m.p.** 110-130°C. **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ 4.45 (s, 4H, CH₂CH₂), 7.06 (d, 4H, J = 8.8 Hz, H_2), 7.87 (d, 4H, J = 8.8 Hz, H_3), 9.91 (s, 2H, COH). **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ 66.58 (CH₂CH₂), 114.94 (C_2), 130.46 (C_4), 132.04 (C_3), 163.45 (C_1), 190.74 (CHO). **MS** (ESI) m/z 293 $[M+Na]^+$.



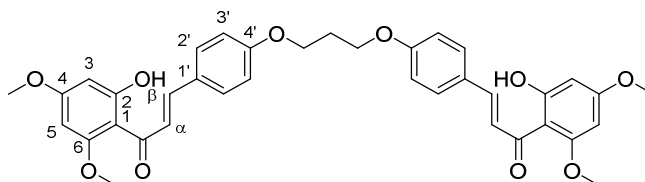
4-(3-(4-Formylphenyloxy)propyloxy)benzaldehyde (42b). The crude was prepared according to general procedure Q starting from 4-hydroxybenzaldehyde (2 g, 16.4 mmol) and 1,3-dibromopropane (1.65 g, 8.2 mmol) and was washed in a mixture of ether/petroleum ether (1:1) to afford **42b** as a white solid (1.8 g, 38%). $C_{17}H_{16}O_4$. **m.p.** 135-137°C. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 2.29 (q, 2H, $J = 6.0$ Hz, $CH_2CH_2CH_2$), 4.24 (t, 4H, $J = 6.0$ Hz, $CH_2CH_2CH_2$), 7.02 (d, 4H, $J = 8.8$ Hz, H_2), 7.84 (d, 4H, $J = 8.8$ Hz, H_3), 9.86 (s, 2H, CHO). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 29.0 ($CH_2CH_2CH_2$), 64.6 ($CH_2CH_2CH_2$), 114.8 (C_2), 130.2 (C_4), 132.0 (C_3), 163.8 (C_1), 190.4 (CHO). **MS** (ESI) m/z 307 $[M+Na]^+$.



2-Hydroxy-4,6-methoxyacetophenone (43). 2,4,6-trihydroxyacetophenone (10 g, 53.7 mmol) was dissolved with potassium carbonate (17 g, 12.1 mmol) in acetone (60 ml) at 0°C. Dimethylsulfate (13.5 g, 107.4 mmol) was added dropwise and the resulting mixture was stirred at room temperature for 2h. The excess of potassium carbonate was filtrated. The filtrate was concentrated under reduced pressure and the residue was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with water, dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude solid was washed with cyclohexane and filtered to afford **43** as a white solid (8.2 g, 77%). $C_{10}H_{12}O_4$. **m.p.** 88-89°C. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 2.60 (s, 3H, $COCH_3$), 3.80 (s, 3H, OCH_3), 3.84 (s, 3H, OCH_3), 5.90 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz, H_3), 6.04 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz, H_5). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 32.9 ($COCH_3$), 55.5 (OCH_3), 90.7 (C_3), 93.4 (C_5), 106.0 (C_1), 162.9 (C_6), 166.0 (C_2); 167.5 (C_4), 203.1 (CO). **MS** (ESI) m/z 195 $[M-H]^-$.

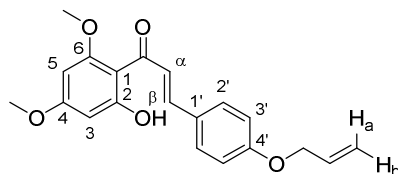


1-(2-Hydroxy-4,6-dimethoxy-phenyl)-3-[4-(2-{4-[3-(2-hydroxy-4,6-dimethoxy-phenyl)-3-oxo-propenyl]-phenyloxy}-ethyloxy)-phenyl]-propenone (44a). The crude was prepared according to general procedure P starting from **42a** (516 mg, 1.9 mmol) and **43** (1.5 g, 7.6 mmol) to afford **44a** as a yellow solid (934 mg, 78%). $C_{36}H_{34}O_{10}$. **m.p.** 220-227°C. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 3.81 (s, 6H, OCH_3), 3.90 (s, 6H, OCH_3), 4.37 (s, 4H, CH_2CH_2), 5.94 (d, 2H, $J = 2.0$ Hz, H_3 or H_5), 6.08 (d, 2H, $J = 2.4$ Hz, H_3 or H_5), 6.96 (d, 4H, $J = 8.8$ Hz, $H_{3'}$), 7.55 (d, 4H, $J = 8.8$ Hz, $H_{2'}$), 7.77 (d, 4H, $J = 3.6$ Hz, H_α , H_β). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ Problem of solubility in DMSO, inconclusive results. **MS** (ESI) m/z 627 $[M]^+$. **Anal.** Calcd for $C_{36}H_{34}O_{10}$: C, 68.94; H, 5.47. Found: C, 68.64; H, 5.62.

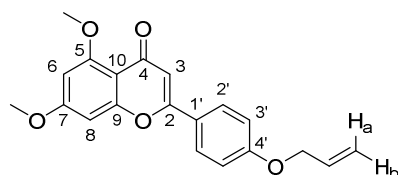


1-(2-Hydroxy-4,6-dimethoxy-phenyl)-3-[4-(3-{4-[3-(2-hydroxy-4,6-dimethoxy-phenyl)-3-oxo-propenyl]-phenyloxy}-propyloxy)-phenyl]-propenone (44b). The crude was prepared according to general procedure P starting from **42b** (300 mg, 1 mmol) and **43** (785 mg, 4 mmol) to afford **44b** as a yellow solid (245 mg, 38%). $C_{37}H_{36}O_{10}$. **m.p.** 192-200°C. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.30 (q, 2H, $J = 6.0$ Hz, $CH_2CH_2CH_2$), 3.82 (s, 6H, OCH_3), 3.90 (s, 6H, OCH_3), 4.21 (t, 4H, $J = 6.0$ Hz, $CH_2CH_2CH_2$), 5.94 (d, 2H, $J = 2.4$ Hz, H_3 or H_5), 6.09 (d, 2H, $J = 2.4$ Hz, H_3 or H_5), 6.92 (d, 4H, $J = 8.8$ Hz, $H_{3'}$), 7.54 (d, 4H, $J = 8.8$ Hz, $H_{2'}$), 7.77 (d, 4H, $J = 3.6$ Hz, H_α , H_β). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) Problem of solubility in DMSO, inconclusive results. **MS** (ESI) m/z 641 $[M+H]^+$. **Anal.** Calcd for $C_{37}H_{36}O_{10}$: C, 69.36; H, 5.66. Found: C, 68.94; H, 5.66.

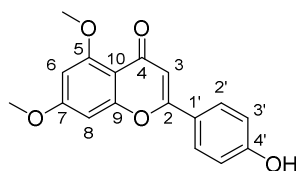
II.2.1.4 Synthesis of compounds 49a and 49b



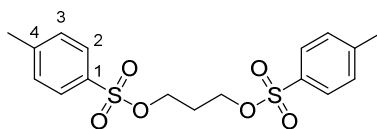
3-(4-Allyloxy-phenyl)-1-(2-hydroxy-4,6-dimethoxy-phenyl)-propenone (45). The crude was prepared according to general procedure L starting from **43** (2.3 g, 11.5 mmol) and **36** (1.9 g, 11.5 mmol) to afford **45** as a yellow solid (1.55 g, 40%). $C_{20}H_{20}O_5$. **m.p.** 110-117°C. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 3.84 (s, 3H, OCH_3), 3.92 (s, 3H, OCH_3), 4.58 (d, 2H, $J = 5.3$ Hz, OCH_2CHCH_2), 5.33 (d, 1H, $J = 10.5$ Hz, H_b), 5.43 (d, 1H, $J = 1.2$ Hz, $J = 17.2$ Hz, H_a), 5.96 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz, H_3 or H_5), 6.07 (m, 1H, OCH_2CHCH_2), 6.11 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz, H_3 or H_5), 6.94 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, $H_{3'}$), 7.55 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, $H_{2'}$), 7.79 (d, 2H, $J = 1.8$ Hz, H_a , H_b). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 55.7 (OCH_3), 56.0 (OCH_3), 69.0 (OCH_2CHCH_2), 91.3 and 93.9 (C_3 and C_5), 106.5 (C_1), 115.2 ($C_{3'}$), 118.2 (OCH_2CHCH_2), 125.3 (C_α or C_β), 128.6 ($C_{1'}$), 130.2 ($C_{2'}$), 132.9 (OCH_2CHCH_2), 142.5 (C_α or C_β), 160.5 ($C_{4'}$), 162.6 and 166.2 (C_4 and C_6), 168.5 (C_2), 192.7 (CO). **MS (ESI)** m/z 341 $[M+H]^+$, 363 $[M+Na]^+$.



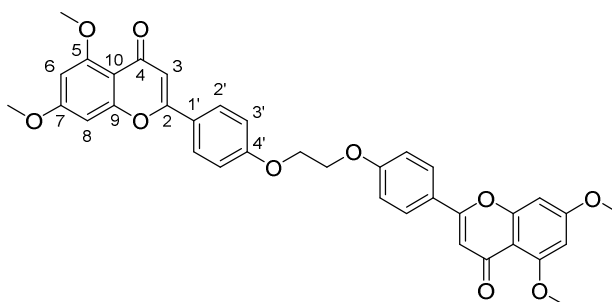
2-(4-Allyloxy-phenyl)-5,7-dimethoxy-chromen-4-one (46). The crude was prepared according to general procedure M starting from **45** (309 mg, 0.9 mmol) to afford **46** as a yellow solid (235 mg, 77%). $C_{20}H_{18}O_5$. **m.p.** 178-183°C. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 3.91 (s, 3H, OCH_3), 3.96 (s, 3H, OCH_3), 4.62 (d, 2H, $J = 5.2$ Hz, OCH_2CHCH_2), 5.34 (d, 1H, $J = 10.5$ Hz, H_b), 5.46 (d, 1H, $J = 17.2$ Hz, H_a), 6.12 (m, 1H, OCH_2CHCH_2), 6.38 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz, H_6 or H_8), 6.56 (d, 1H, $J = 2.2$ Hz, H_6 or H_8), 6.62 (s, 1H, H_3), 7.01 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, $H_{3'}$), 7.82 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, $H_{2'}$). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 55.8 (OCH_3), 56.5 (OCH_3), 69.0 (OCH_2CHCH_2), 92.9 and 96.1 (C_6 and C_8), 107.8 (C_3), 109.3 (C_{10}), 115.1 ($C_{3'}$), 118.2 (OCH_2CHCH_2), 124.0 ($C_{1'}$), 127.6 ($C_{2'}$), 132.6 (OCH_2CHCH_2), 159.9, 160.7, 160.9 and 161.1 (C_2 , C_5 , C_7 and $C_{4'}$), 163.9 (C_9), 177.69 (CO). **MS (ESI)** m/z 339 $[M+H]^+$.



2-(4-Hydroxy-phenyl)-5,7-dimethoxy-chromen-4-one (47). The crude was prepared according to general procedure N starting from **46** (1 g, 3 mmol) to afford **47** as a green solid (856 mg, 97%). $C_{17}H_{14}O_5$. **m.p.** 289-295°C. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 3.82 (s, 3H, OCH_3), 3.89 (s, 3H, OCH_3), 6.49 (s, 1H, H_6 or H_8), 6.59 (s, 1H, H_3), 6.83 (s, 1H, H_6 or H_8), 6.90 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, $H_{3'}$), 7.88 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, $H_{2'}$). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 55.8 (OCH_3), 55.9 (OCH_3), 93.2 and 96.0 (C_6 and C_8), 105.9 (C_{10}), 108.1 (C_3), 115.7 ($C_{3'}$), 121.0 ($C_{1'}$), 127.7 ($C_{2'}$), 159.0, 160.0, 160.1 and 160.6 (C_2 , C_5 , C_7 and $C_{4'}$), 163.4 (C_9), 175.5 (CO). **MS** (ESI) m/z 299 $[M+H]^+$, 321 $[M+Na]^+$.

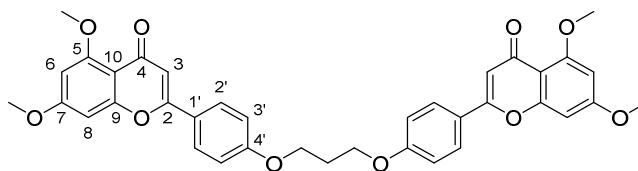


p-Toluenesulfonicacid-2-(p-toluenesulfonyloxy)-propylester (48). The crude was prepared according to general procedure O starting from 1,3-propanediol (500 mg, 6.6 mmol) and was washed with diethyl ether and cyclohexane to afford **48** as a white solid (599 mg, 24%). $C_{17}H_{20}O_6S_2$. **m.p.** 99-102°C. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1.98 (q, 2H, $J = 6.0$ Hz, $CH_2CH_2CH_2$), 2.44 (s, 6H, CH_3), 4.05 (t, 4H, $J = 6.0$ Hz, $CH_2CH_2CH_2$), 7.34 (d, 4H, $J = 8.8$ Hz, H_2), 7.73 (d, 4H, $J = 8.8$ Hz, H_3). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 21.7 (CH_3), 28.7 ($CH_2CH_2CH_2$), 65.9 ($CH_2CH_2CH_2$), 127.9 (C_2), 130.0 (C_3), 132.7 (C_1), 145.12 (C_4). **MS** (ESI) m/z 407 $[M+Na]^+$.



5,7-Dimethoxy-2-(4-{2-[4-(5,7-dimethoxy-4-oxo-4H-chromen-2-yl)-phenoxy]-ethoxy}-phenyl)-chromen-4-one (49a). To a solution of **41** (252 mg, 0.7 mmol) in *N,N*-

dimethylformamide (6 mL) were added potassium carbonate (470 mg, 3.4 mmol), tetrabutylammonium bromide (cat.) and a solution of **47** (405 mg, 1.4 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (6 mL). The mixture was stirred at 25°C for 30 min and at 80°C for 5h. The mixture was poured into water to form a solid which was filtrated and dried in oven. A solution of this solid in *N,N*-dimethylformamide (4 mL) was then added dropwise to a solution of allylbromide (51 mg, 0.4 mmol) and carbonate potassium (133 mg, 1 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (2 mL). The mixture was stirred at 25°C for 30min and at 60°C for 4h until the complete consumption of **47**. The mixture was cooled to 25°C and poured into 1M hydrochloric acid to form a pale green solid which was filtered, dried in oven and washed with diethyl ether and dichloromethane to afford **49a** as a pale green solid (45 mg, 5%). $C_{36}H_{30}O_{10}$. **m.p.** 265-275°C. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 3.82 (s, 6H, OCH_3), 3.89 (s, 6H, OCH_3), 4.46 (s, 4H, CH_2CH_2), 6.50 (d, 2H, $J = 2.0$ Hz, H_6 or H_8), 6.68 (s, 2H, H_3), 6.86 (d, 2H, $J = 2.4$ Hz, H_6 or H_8), 7.16 (d, 4H, $J = 8.8$ Hz, $H_{3'}$), 8.01 (d, 4H, $J = 8.8$ Hz, $H_{2'}$). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): Problem of solubility in DMSO, inconclusive results. **MS** (ESI) m/z 623 $[M+H]^+$, 645 $[M+Na]^+$. **Anal. Calcd for $C_{36}H_{30}O_{10}$:** C, 69,45; H, 4.86. Found: C, 59.40; H, 5.37.



5,7-Dimethoxy-2-(4-{3-[4-(5,7-dimethoxy-4-oxo-4H-chromen-2-yl)-phenyloxy]

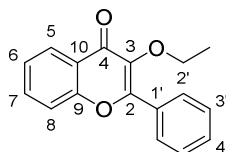
propyloxy}-phenyl)-chromen-4-one (**49b**). To a solution of **48** (258 mg, 0.67 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (6 mL) were added potassium carbonate (460 mg, 3.3 mmol), tetrabutylammonium bromide (cat.) and a solution of **47** (398 mg, 1.3 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (6 mL). The mixture was stirred at 25°C for 30 min, at 80°C for 5h and at 25°C for 20h. The mixture was poured into water to form a solid which was filtrated, dried in oven and washed with diethyl ether to afford **49b** as a pale green solid (316 mg, 37%). $C_{37}H_{32}O_{10}$. **m.p.** 230-240°C. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.22 (q, 2H, $J = 6.0$ Hz, $CH_2CH_2CH_2$), 3.82 (s, 6H, OCH_3), 3.89 (s, 6H, OCH_3), 4.25 (t, 4H, $J = 6.0$ Hz, $CH_2CH_2CH_2$), 6.48 (d, 2H, $J = 2.4$ Hz, H_6 or H_8), 6.65 (s, 2H, H_3), 6.83 (d, 2H, $J = 2.4$ Hz, H_6 or H_8), 7.11 (d, 4H, $J = 8.8$ Hz, $H_{3'}$), 7.97 (d, 4H, $J = 8.8$ Hz, $H_{2'}$). ^{13}C NMR (100 MHz,

CDCl₃) Problem of solubility in DMSO, inconclusive results. **MS** (ESI) m/z 637 [M+H]⁺, 659 [M+Na]⁺. **Anal.** Calcd for C₃₇H₃₂O₁₀: C, 69.80; H, 5.07. Found: C, 59.18; H, 5.37.

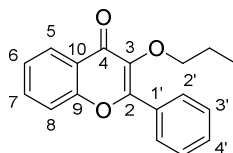
II.2.2. Synthesis of *O*-alkylated and *C*-alkylated derivatives of flavone

II.2.2.1 Synthesis of *O*-alkylated derivatives of flavone 50a to 50d

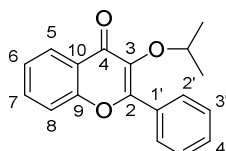
General procedure R. A solution of 3-hydroxyflavone (1 equiv.), potassium carbonate (3 equiv.) and tetrabutylammonium bromide (cat.) in acetone (15 mL/mmol) was refluxed for 30 min. A solution of halogenated derivative (1.1 equiv.) in acetone (5 mL/mmol) and potassium iodide (cat.) were added. The resulting mixture was refluxed for 2-5 h. The solution was cooled to 25°C, poured into water and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with water, dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure.



3-Ethoxy-2-phenyl-4*H*-chromen-4-one (50a). The crude was prepared according to general procedure R starting from 3-hydroxyflavone (400 mg, 1.68 mmol) and bromoethane (202 mg, 1.1 mmol) and was purified by flash silica column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (9:1) as eluent to afford **50a** as a colorless oil (134 mg, 30%). C₁₇H₁₄O₃. **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.21 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, OCH₂CH₃), 4.08 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, OCH₂CH₃), 7.48-7.52 (ddd, 1H, *J* = 1.0 Hz, *J* = 7.0 Hz, *J* = 8.0 Hz, *H*₆), 7.57-7.62 (m, 3H, *H*_{3'}, *H*_{4'}), 7.75 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, *H*₈), 7.81-7.85 (ddd, 1H, *J* = 1.7 Hz, *J* = 7.0 Hz, *J* = 8.6 Hz, *H*₇), 8.07-8.11 (m, 3H, *H*_{2'}, *H*₅). **¹³C NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 15.2 (OCH₂CH₃), 67.7 (OCH₂CH₃), 118.4 (*C*₈), 123.5 (*C*₁₀), 124.9 and 125.0 (*C*₅ and *C*₆), 128.3 and 128.5 (*C*_{2'} and *C*_{3'}), 130.6 (*C*_{1'}), 130.8 (*C*_{4'}), 134.0 (*C*₇), 139.7 (*C*₃), 154.7 and 155.3 (*C*₂ and *C*₉), 174.0 (*C*₄). **MS** (ESI) m/z 267 [M+H]⁺, 289 [M+Na]⁺. **Anal.** Calcd for C₁₇H₁₄O₃: C, 76.68; H, 5.30. Found C, 77.06; H, 5.38.

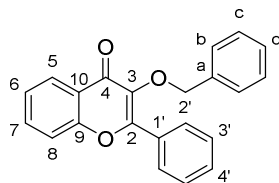


3-Propoxy-2-phenyl-4H-chromen-4-one (50b). The crude was prepared according to general procedure starting R from 3-hydroxyflavone (150 mg, 0.6 mmol) and bromopropane (86 mg, 0.7 mmol) and was purified by flash silica column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (9:1) as eluent to afford **50b** as a white solid (70 mg, 40%). $C_{18}H_{16}O_3$. **m.p.** 36-37°C. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 0.85 (t, 3H, $J = 7.4$ Hz, $CH_2CH_2CH_3$), 1.60 (sex, 2H, $J = 7.4$ Hz, $CH_2CH_2CH_3$), 3.97 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz, $CH_2CH_2CH_3$), 7.47-7.52 (ddd, 1H, $J = 1.1$ Hz, $J = 7.0$ Hz, $J = 8.0$ Hz, H_6), 7.56-7.60 (m, 3H, $H_{3'}$, $H_{4'}$), 7.73 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, H_8), 7.80-7.85 (ddd, 1H, $J = 1.6$ Hz, $J = 7.0$ Hz, $J = 8.5$ Hz, H_7), 8.06 (m, 2H, $H_{2'}$), 8.10 (dd, 1H, $J = 1.5$ Hz, $J = 8.0$ Hz, H_5). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 10.3 ($CH_2CH_2CH_3$), 22.7 ($CH_2CH_2CH_3$), 73.5 ($CH_2CH_2CH_3$), 118.4 (C_8), 123.5 (C_{10}), 124.9 and 125.0 (C_5 and C_6), 128.4 and 128.5 ($C_{2'}$ and $C_{3'}$), 130.6 ($C_{1'}$), 130.8 ($C_{4'}$), 134.0 (C_7), 139.8 (C_3), 154.7 and 155.3 (C_2 and C_9), 174.0 (C_4). **MS** (ESI) m/z 281[M+H] $^+$, 303 [M+Na] $^+$. **Anal.** Calcd for $C_{18}H_{16}O_3$: C, 77.12; H, 5.75. Found C, 76.86; H, 6.39.



3-Isopropoxy-2-phenyl-4H-chromen-4-one (50c). The crude was prepared according to general procedure R starting from 3-hydroxyflavone (200 mg, 0.8 mmol) and 2-bromopropane (114 mg, 0.9 mmol) and was purified by flash silica column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (9:1) as eluent to afford **50c** as a white solid (41 mg, 17%). $C_{18}H_{16}O_3$. **m.p.** 70-72°C. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 1.60 (d, 6H, $J = 6.2$ Hz, $CH(CH_3)_2$), 4.60 (sex, 1H, $J = 6.2$ Hz, $CH(CH_3)_2$), 7.48-7.52 (ddd, 1H, $J = 1.1$ Hz, $J = 7.0$ Hz, $J = 8.0$ Hz, H_6), 7.55-7.60 (m, 3H, $H_{3'}$, $H_{4'}$), 7.75 (d, 1H, $J = 8.5$ Hz, H_8), 7.81-7.85 (ddd, 1H, $J = 1.6$ Hz, $J = 7.0$ Hz, $J = 8.5$ Hz, H_7), 8.09-8.13 (m, 3H, H_5 , $H_{2'}$). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 22.1 ($CH(CH_3)_2$), 74.0 ($CH(CH_3)_2$), 118.4 (C_8), 123.4 (C_{10}), 125.0 (C_5 and C_6), 128.4 and 128.7 ($C_{2'}$ and $C_{3'}$), 130.7 ($C_{4'}$), 131.0 ($C_{1'}$), 134.0 (C_7), 138.5 (C_3), 154.8 and 155.5

(C_2 and C_9), 174.3 (C_4). **MS** (ESI) m/z 281 $[M+H]^+$, 303 $[M+Na]^+$. **Anal. Calcd for $C_{18}H_{16}O_3$** : C, 77.12; H, 5.75. Found C, 74.42; H, 6.38.



3-Benzyloxy-2-phenyl-4H-chromen-4-one (50d). The crude was prepared according to general procedure R starting from 3-hydroxyflavone (250 mg, 1 mmol) and benzylbromide (198 mg, 1.15 mmol) and was purified by flash silica column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (9:1) as eluent to afford **50d** as a yellow solid (230 mg, 67%). $C_{22}H_{16}O_3$. **m.p.** 84-85°C. **1H NMR** (400 MHz, DMSO- d_6) δ 5.09 (s, 2H, OCH_2), 7.27-7.32 (m, 5H, H_b , H_c , H_d), 7.50-7.56 (m, 4H, H_6 , $H_{3'}$, $H_{4'}$), 7.74 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz, H_8), 7.82-7.86 (ddd, 1H, $J = 1.7$ Hz, $J = 7.0$ Hz, $J = 8.6$ Hz, H_7), 7.98-8.00 (m, 2H, $H_{2'}$), 8.14 (dd, 1H, $J = 1.5$ Hz, $J = 8.0$ Hz, H_5). **^{13}C NMR** (100 MHz, DMSO- d_6) δ 73.2 (OCH_2), 118.5 (C_8), 123.5 (C_{10}), 125.0 and 125.1 (C_5 , C_6), 128.0 (C_d), 128.1, 128.3, 128.4, 128.5 ($C_{2'}$, $C_{3'}$, C_b , C_c), 130.4 ($C_{1'}$), 130.8 ($C_{4'}$), 134.1 (C_7), 136.6 (C_a), 139.2 (C_3), 154.8 and 155.8 (C_2 , C_9), 174.0 (C_4). **MS** (ESI) m/z 329 $[M+H]^+$, 351 $[M+Na]^+$. **Anal. Calcd for $C_{22}H_{16}O_3$** : C, 80.47; H, 4.91. Found C, 80.67; H, 5.00.

II.2.2.2 Synthesis of C-alkylated derivatives of flavone

○ General procedures

General procedure S. To a solution of salicylaldehyde (1 equiv.) in diethyl ether (5 mL/mmol) at 0°C was added dropwise alkylmagnesium bromide (5 equiv.). The resulting mixture was stirred at 0°C for 10 min and at 25 °C for 3 h. The solution was slowly poured into water and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with water, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure.

General procedure T. To a solution of alcohol (1 equiv.) in dichloromethane (10 mL/mmol) was added manganese dioxide (19 equiv.). The resulting mixture was stirred at 25°C for 6 h. The solution was filtrated over a pad of celite. The filtrate was washed with water and

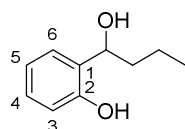
PARTIE EXPÉRIMENTALE

extracted with dichloromethane. The combined organic layer were dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure.

General procedure U. To a solution of phenol (1 equiv.) in dichloromethane (10 mL/mmol) were added triethylamine (3 equiv.) and benzoyl chloride (1.6 equiv.). The resulting mixture was refluxed for 5 h. The solution was cooled to 25°C, poured into water and extracted with dichloromethane. The combined organic layers were washed with 15% sodium hydroxide and water, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure.

General procedure V. To a stirred solution of sodium hydride (60%, 3 equiv.) in dimethyl sulfoxide (4 mL/mmol) was added dropwise a solution of ester (1 equiv.) in dimethyl sulfoxide (8 mL/mmol). The reaction mixture was stirred at 25°C for 3 h then poured into 1M hydrochloric acid and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with water, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to afford the intermediate diketone. This residue was directly dissolved in acetic acid (3.7 mL/mmol) and sulfuric acid (0.04 mL/mmol). The resulting mixture was heated at 95°C for 1 h. The solution was cooled to 25°C and poured carefully into a saturated solution of sodium bicarbonate at 0°C and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with saturated sodium bicarbonate, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure.

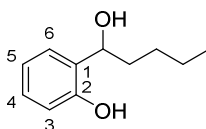
○ *Synthesis of compounds 54a to 54d*



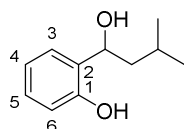
2-(1-Hydroxy-butyl)-phenol (51a). The crude was prepared according general procedure S starting from salicylaldehyde (1.5 g, 12.3 mmol) and propylmagnesium chloride (2M in diethyl ether, 61.4 mmol) to afford **51a** as an yellow oil (607 mg, 25%). $C_{10}H_{14}O_2$. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 0.95 (t, 3H, $J = 7.3$ Hz, $CHOHCH_2CH_2CH_3$), 1.29-1.54 (m, 2H, $CHOHCH_2CH_2CH_3$), 1.73-1.95 (m, 2H, $CHOHCH_2CH_2CH_3$), 2.56 (s, 1H, $CHOHCH_2CH_2CH_3$), 4.84 (t, 1H, $J = 6.5$ Hz, $CHOHCH_2CH_2CH_3$), 6.80-6.88 (m, 2H, H_3 and

PARTIE EXPÉRIMENTALE

H_5), 6.93-6.95 (dd, 1H, $J = 1.7$ Hz, $J = 7.5$ Hz, H_6), 7.14-7.19 (ddd, 1H, $J = 1.7$ Hz, $J = 7.4$ Hz, $J = 8.1$ Hz, H_4), 7.95 (s, 1H, phenol). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ 13.9 ($\text{CHOHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 19.1 ($\text{CHOHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 39.4 ($\text{CHOHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 76.2 ($\text{CHOHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 117.3 (C_3), 119.7 (C_5), 127.3 (C_6), 127.6 (C_1), 128.9 (C_4), 155.7 (C_2). MS (ESI) m/z 165 $[\text{M}-\text{H}]^-$.



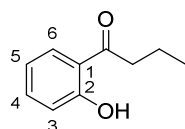
2-(1-Hydroxy-pentyl)-phenol (51b). The crude was prepared according to general procedure S starting from salicylaldehyde (1.5 g, 12.3 mmol) and butylmagnesium bromide (2M in diethyl ether) and was purified by flash silica column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (9:1) as eluent to afford **51b** as a colorless oil (1.2 g, 81%). $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_2$. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 0.90 (t, 3H, $J = 7.0$ Hz, $\text{CHOHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.23-1.45 (m, 4H, $\text{CHOHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.74-1.94 (m, 2H, $\text{CHOHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2.74 (s, 1H, $\text{CHOHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 4.81 (t, 1H, $J = 6.7$ Hz, $\text{CHOHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 6.80-6.87 (m, 2H, H_3 , H_5), 6.92-6.94 (dd, 1H, $J = 1.6$ Hz, $J = 7.5$ Hz, H_6), 7.14-7.18 (ddd, 1H, $J = 1.7$ Hz, $J = 8.1$ Hz, $J = 9.0$ Hz, H_4), 7.99 (s, 1H, OH). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 14.1 ($\text{CHOHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 22.6 ($\text{CHOHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 28.0 ($\text{CHOHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 37.0 ($\text{CHOHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 76.5 ($\text{CHOHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 117.3 (C_3), 119.8 (C_5), 120.1 (C_1), 127.3 (C_6), 129.0 (C_4), 155.7 (C_2). MS (ESI) m/z 161 $[\text{M}-(\text{H}+\text{H}_2\text{O})]^-$, 179 $[\text{M}-\text{H}]^-$.



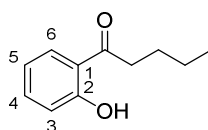
1-(2-Hydroxy-3-methyl-butyl)-phenol (51c). The crude was prepared according to general procedure S starting from salicylaldehyde (1 g, 8.2 mmol) and isobutylmagnesium bromide (2M in diethyl ether) and was purified by flash silica column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (9:1) as eluent to afford **51c** as a colorless oil (1.3 g, 88%). $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_2$. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 0.95 (d, 3H, $J = 6.6$ Hz, $\text{CHOHCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.98 (d, 3H, $J = 6.6$ Hz, $\text{CHOHCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.55-1.92 (m, 3H, $\text{CHOHCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ and $\text{CHOHCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2.46 (s, 1H, $\text{CHOHCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 4.92 (dd, 1H, $J = 5.4$ Hz, $J = 8.9$

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Hz, $\text{CHOHCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 6.80-6.88 (m, 2H, H_3 , H_5), 6.95 (dd, 1H, $J = 1.7$ Hz, $J = 7.5$ Hz, H_6), 7.15-7.19 (m, 1H, H_4), 7.88 (s, 1H, OH). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 22.2 ($\text{CHOHCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 23.2 ($\text{CHOHCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 24.8 ($\text{CHOHCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 46.1 ($\text{CHOHCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 60.6 ($\text{CHOHCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 117.1 (C_3), 119.8 (C_5), 124.8 (C_1), 127.1 (C_6), 129.7 (C_4), 155.4 (C_I). MS (ESI) m/z 161 $[\text{M-H}+\text{H}_2\text{O}]^-$, 179 $[\text{M-H}]^-$.

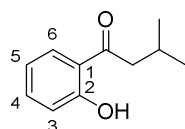


1-(2-Hydroxy-phenyl)-butan-1-one (52a). The crude was prepared according to general procedure T starting from **51a** (607 mg, 3.6 mmol) and was purified by flash silica column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (9:1) as eluent to afford **52a** as a colorless oil (274 mg, 46%). $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_2$. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 1.03 (t, 3H, $J = 7.4$ Hz, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.79 (quint, 2H, $J = 4.3$ Hz, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2.97 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 6.87-6.91 (ddd, 1H, $J = 1.2$ Hz, $J = 7.2$ Hz, $J = 9.2$ Hz, H_5), 6.97-6.99 (dd, 1H, $J = 1.0$ Hz, $J = 8.4$ Hz, H_3), 7.44-7.48 (ddd, 1H, $J = 7.2$ Hz, $J = 1.6$ Hz, $J = 9.9$ Hz, H_4), 7.76-7.78 (dd, 1H, $J = 1.6$ Hz, $J = 8.0$ Hz, H_6), 12.40 (s, 1H, OH). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 14.0 ($\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 18.1 ($\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 40.3 ($\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 118.7 and 118.9 (C_3 and C_5), 119.5 (C_I), 130.1 (C_6), 136.3 (C_4), 162.7 (C_2), 206.9 (CO). MS (ESI) m/z 163 $[\text{M-H}]^-$.

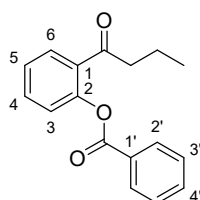


1-(2-Hydroxy-phenyl)-pentan-1-one (52b). The crude was prepared according to general procedure T starting from **51b** (1.1 g, 6.3 mmol) and was purified by flash silica column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (95:5) as eluent to afford **52b** as a colorless oil (457 mg, 41%). $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_2$. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 0.97 (t, 3H, $J = 7.4$ Hz, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.38-1.48 (m, 2H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.69-1.77 (m, 2H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2.99 (t, 2H, $J = 7.4$ Hz, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 6.88-6.92 (ddd, 1H, $J = 1.1$ Hz, $J = 7.1$ Hz, $J = 8.2$ Hz, H_5), 6.97-6.99 (dd, 1H, $J = 0.7$ Hz, $J = 8.4$ Hz, H_3), 7.44-7.46 (ddd, 1H, $J = 1.6$ Hz, $J = 7.3$ Hz, $J = 8.5$ Hz, H_4), 7.76-7.78 (dd, 1H, $J = 1.6$ Hz, $J = 8.0$ Hz,

H_6), 12.41 (s, 1H, OH). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 14.0 ($\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 22.6 ($\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 26.8 ($\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 38.2 ($\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 118.7 and 119.0 (C_3 and C_5), 119.5 (C_1), 130.1 (C_6), 136.3 (C_4), 162.6 (C_2), 207.1 (CO). MS (ESI) m/z 177 $[\text{M-H}]^-$.

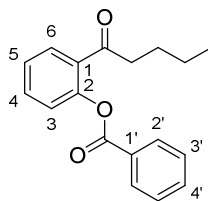


1-(2-Hydroxy-phenyl)-3-methylbutan-1-one (52c). The crude was prepared according to general procedure T starting from **51c** (1.7 g, 9.7 mmol) and was purified by flash silica column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (9:1) as eluent to afford **52c** as a colorless oil (445 mg, 26%). $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_2$. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 1.01 (d, 6H, $J = 6.6$ Hz, $\text{COCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2.25-2.35 (m, 1H, $\text{COCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2.84 (d, 2H, $J = 6.9$ Hz, $\text{COCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 6.87-6.91 (ddd, 1H, $J = 1.1$ Hz, $J = 7.3$ Hz, $J = 8.1$ Hz, H_5), 6.97-6.99 (dd, 1H, $J = 1.0$ Hz, $J = 8.4$ Hz, H_3), 7.44-7.48 (ddd, 1H, $J = 1.6$ Hz, $J = 7.4$ Hz, $J = 8.6$ Hz, H_4), 7.74-7.77 (dd, 1H, $J = 1.6$ Hz, $J = 8.0$ Hz, H_6), 12.47 (s, 1H, OH). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 22.9 ($\text{COCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 25.7 ($\text{COCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 47.3 ($\text{COCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 118.7 and 118.9 (C_3 and C_5), 119.8 (C_1), 130.3 (C_6), 136.4 (C_4), 162.8 (C_2), 206.7 (CO). MS (ESI) m/z 177 $[\text{M-H}]^-$.

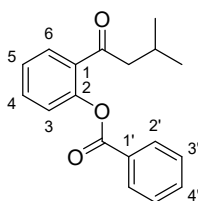


Benzoic acid 2-butyryl-phenyl ester (53a). The crude was prepared according to general procedure U starting from **52a** (274 mg, 1.7 mmol) and was purified by flash silica column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (100:0 to 9:1) eluent to afford **53a** as a colorless oil (178 mg, 40%). $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_3$. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 0.88 (t, 3H, $J = 7.4$ Hz, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.66 (sex, 2H, $J = 7.4$ Hz, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2.86 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 7.23 (dd, 1H, $J = 1.0$ Hz, $J = 8.1$ Hz, H_3), 7.36 (td, 1H, $J = 1.2$ Hz, $J = 7.7$ Hz, H_5), 7.50-7.58 (m, 3H, H_4 , $H_{3'}$), 7.63-7.67 (m, 1H, $H_{4'}$), 7.80 (dd, 1H, $J = 1.6$ Hz, $J = 7.8$ Hz, H_6), 8.19-8.22 (m, 2H, $H_{2'}$). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 13.8 ($\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 17.8 ($\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 43.9 ($\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 124.0 and 126.3 (C_3 and C_4), 128.8 ($C_{3'}$), 129.4

(C_I), 129.8 (C_6), 130.4 ($C_{2'}$), 132.0 ($C_{I'}$), 133.0 and 133.9 (C_4 and $C_{4'}$), 149.1 (C_2), 165.3 (COO), 200.7 (CO). **MS (ESI)** m/z 291 [$M+Na$] $^+$.



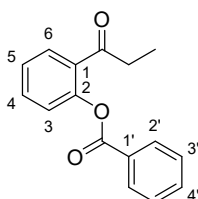
Benzoic acid 2-pentanoyl-phenyl ester (53b). The crude was prepared according to general procedure U starting from **52b** (457 mg, 2.6 mmol) and was purified by flash silica column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (95:5) as eluent to afford **53b** as a colorless oil (377 mg, 52%). $C_{18}H_{18}O_3$. 1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 0.79 (t, 3H, $J = 7.3$ Hz, $COCH_2CH_2CH_2CH_3$), 1.17-1.27 (m, 2H, $COCH_2CH_2CH_2CH_3$), 1.44-1.51 (m, 2H, $COCH_2CH_2CH_2CH_3$), 2.90 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz, $COCH_2CH_2CH_2CH_3$), 7.37 (dd, 1H, $J = 1.0$ Hz, $J = 8.0$ Hz, H_3), 7.43-7.47 (td, 1H, $J = 1.1$ Hz, $J = 7.6$ Hz, H_5), 7.60-7.64 (m, 2H, $H_{3'}$), 7.65-7.69 (ddd, 1H, $J = 1.7$ Hz, $J = 8.0$ Hz, $J = 9.2$ Hz, H_4), 7.74-7.79 (m, 1H, $H_{4'}$), 7.92 (dd, 1H, $J = 1.6$ Hz, $J = 7.8$ Hz, H_6), 8.09-8.12 (m, 2H, $H_{2'}$). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 13.6 ($COCH_2CH_2CH_2CH_3$), 21.6 ($COCH_2CH_2CH_2CH_3$), 25.7 ($COCH_2CH_2CH_2CH_3$), 40.6 ($COCH_2CH_2CH_2CH_3$), 124.0 and 126.4 (C_3 and C_5), 128.9 (C_I), 129.0 ($C_{3'}$), 129.7 (C_6), 129.8 ($C_{2'}$), 131.3 ($C_{I'}$), 133.2 and 134.1 (C_4 and $C_{4'}$), 148.2 (C_2), 164.5 (COO), 200.2 (CO). **MS (ESI)** m/z 283 [$M+H$] $^+$, 305 [$M+Na$] $^+$.



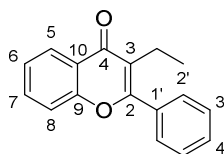
Benzoic acid 2-(3-methylbutyryl)-phenyl ester (53c). The crude was prepared according to general procedure U starting from **52c** (445 mg, 2.5 mmol) and was purified by flash silica column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (95:5) as eluent to afford **53c** as a colorless oil (321 mg, 45%). $C_{18}H_{18}O_3$. 1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 0.82 (s, 3H, $COCH_2CH(CH_3)_2$), 0.84 (s, 3H, $COCH_2CH(CH_3)_2$), 2.02 (m, 1H, $COCH_2CH(CH_3)_2$), 2.78 (d, 2H, $J = 6.9$ Hz, $COCH_2CH(CH_3)_2$), 7.37 (dd, 1H, $J = 1.0$ Hz, $J = 8.1$ Hz, H_3), 7.43-7.45 (td,

PARTIE EXPÉRIMENTALE

1H, $J = 1.1$ Hz, $J = 7.6$ Hz, H_5), 7.60-7.69 (m, 3H, H_4 , $H_{3'}$), 7.74-7.78 (m, 1H, $H_{4'}$), 7.94 (dd, 1H, $J = 1.6$ Hz, $J = 7.8$ Hz, H_6), 8.09-8.11 (m, 2H, $H_{2'}$). **^{13}C NMR** (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 22.2 ($\text{COCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 24.2 ($\text{COCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 49.8 ($\text{COCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 124.0 and 126.4 (C_3 and C_5), 128.9 (C_1), 129.0 ($C_{3'}$), 129.7 (C_6), 129.8 ($C_{2'}$), 131.5 ($C_{1'}$), 133.1 and 134.0 (C_4 and $C_{4'}$), 148.2 (C_2), 164.5 (COO), 200.0 (CO). **MS** (ESI) m/z 283 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 305 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

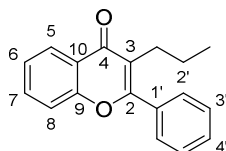


Benzoic acid 2-propanoyl-phenyl ester (53d). The crude was prepared according to general procedure U starting from 2'-hydroxypropiophenone and was purified by flash silica column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (95:5) as eluent and recrystallized in cyclohexane to afford **53d** as a white solid (8 g, 94%). $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_3$. **m.p.** 58-59°C. **^1H NMR** (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 0.97 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, COCH_2CH_3), 2.94 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, COCH_2CH_3), 7.37 (dd, 1H, $J = 0.9$ Hz, $J = 8.1$ Hz, H_3), 7.46 (td, 1H, $J = 1.1$ Hz, $J = 7.6$ Hz, H_5), 7.61-7.62 (m, 2H, $H_{3'}$), 7.65-7.69 (ddd, 1H, $J = 1.6$ Hz, $J = 7.9$ Hz, $J = 9.2$ Hz, H_4), 7.74-7.78 (m, 1H, $H_{4'}$), 7.95 (dd, 1H, $J = 1.6$ Hz, $J = 7.8$ Hz, H_6), 8.10-8.13 (m, 2H, $H_{2'}$). **^{13}C NMR** (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 8.0 (COCH_2CH_3), 34.0 (COCH_2CH_3), 124.0 and 126.4 (C_3 and C_5), 128.9 (C_1), 129.0 ($C_{3'}$), 129.7 (C_6), 129.8 ($C_{2'}$), 130.9 ($C_{1'}$), 133.2 (C_4), 134.0 ($C_{4'}$), 148.3 (C_2), 164.6 (COO), 200.5 (CO). **MS** (ESI) m/z 277 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

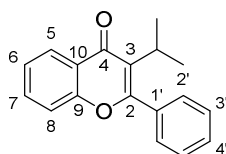


3-Ethyl-2-phenyl-chromen-4-one (54a). The crude was prepared according to general procedure V starting from **53a** (178 mg, 0.7 mmol) and was purified by flash silica column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (100:0 to 9:1) as eluent to afford **54a** as a colorless oil (26 mg, 15%). $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_2$. **^1H NMR** (CDCl_3 , 400 MHz) δ 1.18 (t, 3H, $J = 7.3$ Hz, CH_2CH_3), 2.58 (q, 2H, $J = 7.4$ Hz, CH_2CH_3), 7.37-7.42 (m, 1H, H_6), 7.43 (m, 1H, H_8), 7.52-7.53 (m, 3H, $H_{3'}$, $H_{4'}$), 7.60-7.67 (m, 3H, H_7 , $H_{2'}$), 8.26 (dd, 1H, $J = 1.3$ Hz, $J = 8.0$ Hz, H_5).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 14.0 (CH_2CH_3), 19.4 (CH_2CH_3), 118.1 (C_8), 123.2 (C_3), 123.6 (C_{10}), 124.8 (C_6), 126.1 (C_5), 128.7 ($\text{C}_{2'}$ and $\text{C}_{3'}$), 130.3 ($\text{C}_{4'}$), 133.5 (C_7), 133.7 ($\text{C}_{1'}$), 156.3 (C_9), 161.6 (C_2), 178.5 (C_4). **MS** (ESI) m/z 251 $[\text{M}+\text{H}]^+$. **Anal.** Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_2$: C, 81.58; H, 5.64. Found C, 80.02; H, 5.75.

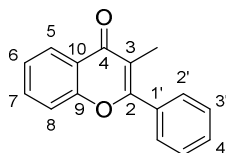


2-Phenyl-3-propyl-chromen-4-one (54b). The crude was prepared according to general procedure V starting from **53b** (347 mg, 1.2 mmol). The intermediate diketone was purified by flash silica column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (9:1) as eluent to afford **54b** as a colorless oil (58 mg, 17%). $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_2$. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 0.90 (t, 3H, $J = 7.4$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.15-1.64 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2.51-2.55 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 7.37-4.71 (m, 1H, H_6), 7.42-7.44 (dd, 2H, $J = 0.4$ Hz, $J = 8.4$ Hz, H_8), 7.51-7.53 (m, 3H, $H_{3'}$, $H_{4'}$), 7.56-7.67 (m, 3H, H_7 , $H_{2'}$), 8.25 (dd, 1H, $J = 1.6$ Hz, $J = 8.0$ Hz, H_5). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 14.3 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 22.6 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 27.9 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 118.0 (C_8), 122.4 (C_3), 123.1 (C_{10}), 124.8 (C_6), 126.1 (C_5), 128.6 and 128.8 ($\text{C}_{2'}$ and $\text{C}_{3'}$), 130.2 ($\text{C}_{4'}$), 133.4 (C_7), 133.8 ($\text{C}_{1'}$), 156.3 (C_9), 161.9 (C_2), 178.6 (C_4). **MS** (ESI) m/z 265 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 287 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. **Anal.** Calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_2$: C, 81.79; H, 6.10. Found C, 79.58; H, 6.21 ($\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_2 + 0.4 \text{H}_2\text{O}$).



3-Isopropyl-2-phenyl-chromen-4-one (54c). The crude was prepared according to general procedure V starting from **53c** (306 mg, 1.1 mmol) and was purified by flash silica column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (95:5) as eluent to afford **54c** as a colorless oil (27 mg, 11%). $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_2$. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 1.37 (s, 3H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.39 (s, 3H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2.90 (sept, 1H, $J = 7.0$ Hz, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 7.35-7.40 (m, 2H, H_6 , H_8), 7.50-7.57 (m, 5H, $H_{2'}$, $H_{3'}$, $H_{4'}$), 7.60-7.65 (m, 1H, H_7), 8.23 (dd, 1H, $J = 1.2$ Hz, $J = 7.9$ Hz, H_5). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 20.6 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 29.2 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 117.9 (C_8), 124.1 (C_3), 124.8

(C_6), 125.9 (C_5), 126.1 (C_{10}), 128.6 and 128.8 ($C_{2'}$ and $C_{3'}$), 130.1 ($C_{4'}$), 133.3 (C_7), 134.1 ($C_{1'}$), 156.0 (C_9), 161.7 (C_2), 178.6 (C_4). **MS** (ESI) m/z 265 $[M+H]^+$. **Anal.** Calcd for $C_{18}H_{16}O_2$: C, 81.79; H, 6.10. Found C, 78.93; H, 6.67.

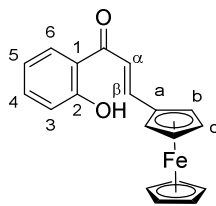


3-Methyl-2-phenyl-chromen-4-one (54d). The crude was prepared according to general procedure V starting from **53d** (1.2 g, 4.7 mmol) to afford **54d** as a yellow oil (382 mg, 6%). $C_{16}H_{12}O_2$. **m.p.** 74-75°C. **1H NMR** ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 2.17 (s, 3H, CH_3), 7.38-7.42 (m, 1H, H_6), 7.45 (dd, 1H, $J = 0.4$ Hz, $J = 8.4$ Hz, H_8), 7.52-7.54 (m, 3H, $H_{3'}$, $H_{4'}$), 7.63-7.68 (m, 3H, H_7 , $H_{2'}$), 8.26 (dd, 1H, $J = 1.7$ Hz, $J = 8.0$ Hz, H_5). **^{13}C NMR** ($CDCl_3$, 100 MHz) δ 11.9 (CH_3), 117.7 (C_3), 118.0 (C_8), 122.7 (C_{10}), 124.9 (C_6), 126.0 (C_5), 128.6 and 129.1 ($C_{2'}$ and $C_{3'}$), 130.3 ($C_{4'}$), 133.5 (C_7), 133.6 ($C_{1'}$), 156.3 (C_9), 161.2 (C_2), 179.0 (C_4). **MS** (ESI) m/z 237 $[M+H]^+$, 259 $[M+Na]^+$. **Anal.** Calcd for $C_{16}H_{12}O_2$: C, 81.34; H, 5.12. Found C, 81.44; H, 5.29.

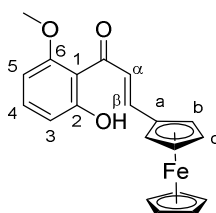
II.2.3. Synthesis of ferrocene derivatives

II.2.3.1 Synthesis of ferrocenyl chalcone

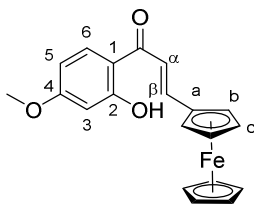
General procedure W. To a solution of acetophenone derivative (1 equiv.) in tetrahydrofuran (4 mL/mmol) was added sodium hydride (4 equiv.). The resulting mixture was stirred at 25°C for 30 min and ferrocene carboxaldehyde (1.5 equiv.) was added in tetrahydrofuran (4 mL/mmol) and the mixture was stirred at 25°C for 4-8 h. The solution was poured into 1M hydrochloric acid and extracted with dichloromethane. The combined organic layers were washed with water, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure.



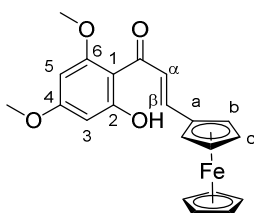
(E)-1-(2-Hydroxyphenyl)-3-ferrocenylpropenone (55a). The crude was prepared according to general procedure W starting from commercially available 2-hydroxyacetophenone (640 mg, 4.7 mmol) and was recrystallized in cyclohexane to afford **55a** as a violet solid (1.2 g, 74%). $C_{19}H_{16}FeO_2$. **m.p.** 160-161 °C. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 4.21 (s, 5H, C_5H_5), 4.61 (s, 2H, H_c), 4.91 (s, 2H, H_b), 6.97-7.01 (m, 2H, H_3 , H_5), 7.55-7.58 (m, 2H, H_a , H_4), 7.82 (d, 1H, J = 15.0 Hz, H_β), 8.16 (d, 1H, J = 7.5 Hz, H_6), 12.9 (s, 1H, OH). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 69.6 (C_b), 69.7 (C_5H_5), 71.9 (C_c), 78.7 (C_a), 117.7, 117.9, 119.0 and 120.4 (C_1 , C_3 , C_5 and C_a), 130.4 (C_6), 135.9 (C_4), 148.1 (C_β), 162.1 (C_2), 192.6 (CO). **MS** (ESI) m/z 332 $[M]^+$, 355 $[M+Na]^+$. **Anal. Calcd for $C_{19}H_{16}FeO_2$:** C, 65.53; H, 4.64. Found C, 68.41; H, 4.99.



(E)-1-(2-Hydroxy-6-methoxyphenyl)-3-ferrocenylpropenone (55b). The crude was prepared according to general procedure W starting from 2-hydroxy-6-methoxyacetophenone (1 g, 6 mmol) and was recrystallized in cyclohexane/ethyl acetate (8:2) to afford **55b** as a violet solid (1.6 g, 72%). $C_{20}H_{18}FeO_3$. **m.p.** 129-130 °C. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 3.74 (s, 3H, OCH_3), 4.18 (s, 5H, C_5H_5), 4.50 (t, 2H, J = 1.7 Hz, H_c), 4.69 (t, 2H, J = 1.7 Hz, H_b), 6.55 (d, 2H, J = 9.0 Hz, H_3 , H_5), 6.64 (d, 1H, J = 15.8 Hz, H_a), 7.14 (d, 1H, J = 15.8 Hz, H_β), 7.22 (t, 1H, J = 8.3 Hz, H_4), 10.26 (s, 1H, OH). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 55.6 (OCH_3), 69.0 (C_b), 69.6 (C_5H_5), 71.4 (C_c), 78.4 (C_a), 102.2 (C_5), 108.9 (C_3), 115.9 (C_1), 125.7 (C_a), 131.1 (C_4), 147.0 (C_β), 156.6 and 157.8 (C_2 and C_6), 193.9 (CO). **MS** (ESI) m/z 385 $[M+Na]^+$. **Anal. Calcd for $C_{20}H_{18}FeO_3$:** C, 66.31; H, 5.02. Found C, 66.29; H, 5.07.

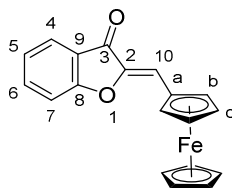


(E)-1-(2-Hydroxy-4-methoxyphenyl)-3-ferrocenyl-propenone (55c). The crude was prepared according to general procedure W starting from 2-hydroxy-4-methoxyacetophenone (1 g, 6 mmol) and was recrystallized in cyclohexane to afford **55c** as a violet solid (2 g, 92%). $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{FeO}_3$. **m.p.** 158-160 °C. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 3.84 (s, 3H, OCH_3), 4.20 (s, 5H, C_5H_5), 4.59 (t, 2H, $J = 1.7$ Hz, H_c), 4.90 (t, 2H, $J = 1.7$ Hz, H_b), 6.50 (s, 1H, H_3), 6.55 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz, H_5), 7.53 (d, 1H, $J = 15.2$ Hz, H_a), 7.79 (d, 1H, $J = 15.2$ Hz, H_β), 8.16 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz, H_6), 13.74 (s, 1H, OH). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ 55.7 (OCH_3), 69.6 (C_b), 69.7 (C_5H_5), 71.6 (C_c), 78.9 (C_a), 100.9 (C_3), 107.3 (C_5), 113.6 (C_1), 117.5 (C_a), 132.2 (C_6), 147.0 (C_β), 165.6 and 165.8 (C_2 and C_4), 191.0 (CO). **MS** (ESI) m/z 385 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. **Anal.** Calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{FeO}_3$: C, 66.3; H, 5.02. Found C, 65.42; H, 4.91.



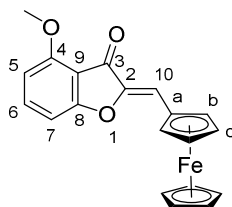
(E)-1-(2-Hydroxy-4,6-dimethoxyphenyl)-3-ferrocenyl-propenone (55d). The crude was prepared according to general procedure W starting from **43** (410 mg, 2.1 mmol) and was recrystallized in cyclohexane/diethyl ether (2:1) to afford **55d** as a violet solid (281 mg, 34%). $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{FeO}_4$. **m.p.** 143-144 °C. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 3.81 (s, 3H, OCH_3), 3.88 (s, 3H, OCH_3), 4.19 (s, 5H, C_5H_5), 4.54 (t, 2H, $J = 1.7$ Hz, H_c), 4.72 (t, 2H, $J = 1.7$ Hz, H_b), 6.12 (d, 2H, $J = 10.1$ Hz, H_3 , H_5), 7.28 (d, 1H, $J = 15.4$ Hz, H_a), 7.54 (d, 1H, $J = 15.4$ Hz, H_β), 13.41 (s, 1H, OH). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ 55.6 and 56.0 (OCH_3), 69.0 (C_b), 69.6 (C_5H_5), 71.3 (C_c), 79.1 (C_a), 90.9 and 93.9 (C_3 and C_5), 106.3 (C_1), 124.4 (C_a), 145.3 (C_β), 161.5, 164.9 and 165.0 (C_2 , C_4 and C_6), 191.6 (CO). **MS** (ESI) m/z 415 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. **Anal.** Calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{FeO}_4$: C, 64.30; H, 5.15. Found C, 64.29; H, 5.30.

II.2.3.2 Synthesis of ferrocenyl aurones



(Z)-2-Ferrocenylidene-benzofuran-3-one (56a). To a solution of benzofuran-3(2*H*)-one (500 mg, 3.7 mmol) in dichloromethane (75 mL) were added ferrocene carboxaldehyde (1.2 g, 5.6 mmol) and neutral aluminium oxide (15 g, 4 g/mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature for 8 h. The solution was filtered through a pad of celite and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The crude was recrystallized in cyclohexane to afford **56a** as a violet solid (898 mg, 75%). $C_{19}H_{14}FeO_2$. **m.p.** 163-165 °C. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 4.22 (s, 5H, C_5H_5), 4.65 (t, 2H, $J = 1.8$ Hz, H_c), 4.95 (t, 2H, $J = 1.8$ Hz, H_b), 6.91 (s, 1H, H_{10}), 7.27-7.31 (t, 1H, $J = 7.8$ Hz, H_5), 7.53 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, H_7), 7.76-7.80 (m, 2H, H_4 , H_6). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 69.7 (C_5H_5), 71.3 (C_b), 71.7 (C_c), 74.7 (C_a), 113.2 (C_7), 116.0 (C_{10}), 121.8 (C_9), 123.5 and 123.9 (C_4 and C_5), 136.7 (C_6), 145.1 (C_2), 164.6 (C_8), 181.4 (CO). **MS** (ESI) m/z 331 $[M+H]^+$, 353 $[M+Na]^+$. **Anal.** Calcd for $C_{19}H_{14}FeO_2$: C, 69.12; H, 4.27. Found C, 68.82; H, 3.91.

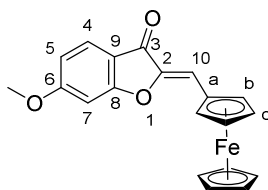
General procedure X. To a solution of ferrocenyl chalcone (1 equiv.) in pyridine (18 mL/mmol) was added mercury (II) acetate (2.5 equiv.). The resulting mixture was refluxed for 5 h. The solution was cooled to 25°C, poured into 6M hydrochloric acid at 0°C and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with water, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure.



(Z)-2-Ferrocenylidene-4-methoxy-benzofuran-3-one (56b). The crude was prepared according to general procedure X starting from **55b** (782 mg, 2.2 mmol) and was purified by flash silica column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (9:1 to 8:2) as eluent to

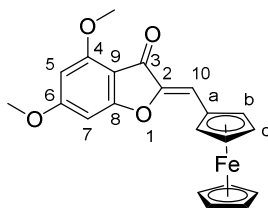
PARTIE EXPÉRIMENTALE

afford **56b** as a violet solid (786 mg, 95%). $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{FeO}_3$. **m.p.** 204-205°C. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 3.91 (s, 3H, OCH_3), 4.20 (s, 5H, C_5H_5), 4.60 (t, 2H, $J = 1.7$ Hz, H_c), 4.90 (t, 2H, $J = 1.7$ Hz, H_b), 6.74 (s, 1H, H_{10}), 6.80 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz, H_5 or H_7), 7.02 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, H_5 or H_7), 7.69 (t, 1H, $J = 8.2$ Hz, H_6). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6) δ 56.1 (OCH_3), 69.7 (C_5H_5), 71.1 (C_b), 71.4 (C_c), 75.0 (C_a), 104.7 and 105.7 (C_5 and C_7), 110.7 (C_9), 114.1 (C_{10}), 138.5 (C_6), 145.2 (C_2), 157.9 (C_4), 165.7 (C_8), 179.2 (CO). **MS** (ESI) m/z 361 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 383 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. **Anal. Calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{FeO}_3$:** C, 66.68; H, 4.49. Found C, 65.16; H, 4.51.

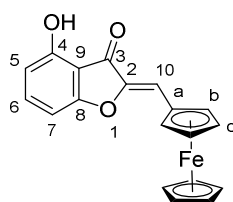


(Z)-2-Ferrocenylidene-6-methoxy-benzofuran-3-one (56c). The crude was prepared according to general procedure X starting from **55c** (393 mg, 1.1 mmol) and was purified by flash silica column chromatography, using cyclohexane/ethyl acetate (9:1) as eluent to afford **56c** as a violet solid (123 mg, 32%). $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{FeO}_3$. **m.p.** 205-206°C. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 3.93 (s, 3H, OCH_3), 4.21 (s, 5H, C_5H_5), 4.60 (t, 2H, $J = 1.7$ Hz, H_c), 4.91 (t, 2H, $J = 1.7$ Hz, H_b), 6.78 (s, 1H, H_{10}), 6.83 (dd, 1H, $J = 2.1$ Hz, $J = 8.6$ Hz, H_5), 7.11 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz, H_7), 7.65 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz, H_4). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6) δ 56.3 (OCH_3), 69.7 (C_b), 71.1 (C_5H_5), 71.4 (C_c), 74.9 (C_a), 97.1 (C_7), 112.4 and 114.4 (C_5 and C_{10}), 114.8 (C_9), 125.2 (C_4), 146.1 (C_2), 166.9 and 167.2 (C_6 and C_8), 179.8 (CO). **MS** (ESI) m/z 361 $[\text{M}+\text{H}]^+$. **Anal. Calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{FeO}_3$:** C, 66.68; H, 4.49. Found C, 66.2; H, 4.65.

General procedure Y. To a solution of benzofuranone (1 equiv.) in methanol (15 mL/mmol) were added a solution of potassium hydroxide (50% in H_2O , 1.5 mL/mmol) and ferrocene carboxaldehyde (1.5 equiv.). The mixture was refluxed for 5h. The solution was cooled to 25°C and concentrated under reduced pressure. The residue was poured into water and 1M hydrochloric acid and extracted with dichloromethane. The combined organic layers were washed with water, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure.

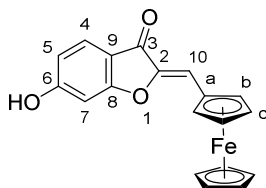


(Z)-4,6-Dimethoxy-2-ferrocenylidene-benzofuran-3-one (56d). The crude was prepared according to general procedure Y starting from 4,6-dimethoxybenzofuran-3(2*H*)-one (500 mg, 2.6 mmol) and was purified by flash silica column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (7:3) as eluent to afford **56d** as a violet solid (763 mg, 76%). $C_{21}H_{18}FeO_4$. **m.p.** 193-194°C. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 3.87 (s, 3H, OCH_3), 3.91 (s, 3H, OCH_3), 4.18 (s, 5H, C_5H_5), 4.55 (s, 2H, H_c), 4.86 (s, 2H, H_b), 6.31 (s, 1H, H_{10}), 6.62 (s, 1H, H_5 or H_7), 6.67 (s, 1H, H_5 or H_7). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 56.3 and 56.4 (OCH_3), 69.5 (C_5H_5), 70.7 (C_b), 71.0 (C_c), 75.1 (C_a), 89.7 and 94.1 (C_5 and C_7), 104.8 (C_9), 112.2 (C_{10}), 146.1 (C_2), 158.7 (C_4 or C_6), 167.6 and 168.3 (C_4 or C_6 and C_8), 177.6 (CO). **MS** (ESI) m/z 391 $[M+H]^+$, 413 $[M+Na]^+$. **Anal.** Calcd for $C_{22}H_{18}FeO_4$: C, 64.63; H, 4.66. Found C, 62.29; H, 4.39.

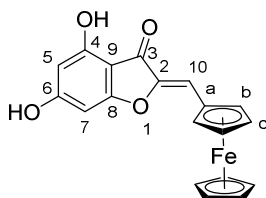


(Z)-2-Ferrocenylidene-4-hydroxy-benzofuran-3-one (57a). To a solution of **56b** (200 mg, 0.6 mmol) in dichloromethane (12 mL) was added aluminium chloride (228 mg, 1.7 mmol). The resulting mixture was refluxed for 4h. The solution was cooled to 25 °C, poured into 6M hydrochloric acid at 0°C and extracted with dichloromethane. The combined organic layers were washed with water, dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by flash silica column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (9:1) as eluent to afford **57a** as a violet solid (15 mg, 8%). $C_{19}H_{14}FeO_3$. **m.p.** 148-149°C. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 4.19 (s, 5H, C_5H_5), 4.57 (t, 2H, $J = 1.7$ Hz, H_c), 4.86 (t, 2H, $J = 1.7$ Hz, H_b), 6.59 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, H_5 or H_7), 6.76 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, H_5 or H_7), 6.85 (s, 1H, H_{10}), 7.49 (t, 1H, $J = 8.2$ Hz, H_6), 7.90 (s, 1H, OH). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 70.1 (C_5H_5), 71.7 and 72.1 (C_b and C_c), 74.9 (C_a), 103.7 and 109.4 (C_5 and C_7), 110.6 (C_9), 116.9 (C_{10}), 138.5 (C_6), 145.6 (C_2), 156.8 (C_4), 164.4 (C_8),

183.9 (CO). **MS** (ESI) m/z 369 $[M+Na]^+$. **Anal.** Calcd for $C_{19}H_{14}FeO_3$: C, 65.92; H, 4.08. Found C, 64.99; H, 4.07.



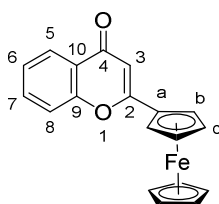
(Z)-2-Ferrocenylidene-6-hydroxy-benzofuran-3-one (57b). The crude was prepared according to general procedure Y starting from 6-hydroxy-2,3-hydrobenzo[*b*]furan-3-one (300 mg, 2 mmol) and was purified by flash silica column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (9:1 to 8:2) as eluent to afford **57b** as a violet solid (31 mg, 4%). $C_{19}H_{14}FeO_3$. **m.p.** 271-272°C. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 4.19 (s, 5H, C_5H_5), 4.57 (t, 2H, $J = 1.7$ Hz, H_c), 4.88 (t, 2H, $J = 1.7$ Hz, H_b), 6.65 (dd, 1H, $J = 1.7$ Hz, $J = 8.5$ Hz, H_5), 6.68 (s, 1H, H_{10}), 6.72 (d, 1H, $J = 1.7$ Hz, H_7), 7.56 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, H_4). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 69.6 (C_b), 71.0 (C_5H_5), 71.2 (C_c), 75.1 (C_a), 98.6 (C_7), 112.8 and 113.4 (C_5 and C_{10}), 113.7 (C_9), 125.6 (C_4), 146.3 (C_2), 166.0 and 167.2 (C_6 and C_8), 179.9 (CO). **MS** (ESI) m/z 345 $[M-H]^-$. **Anal.** Calcd for $C_{19}H_{14}FeO_3$: C, 65.92; H, 4.08. Found C, 66.30; H, 4.83.



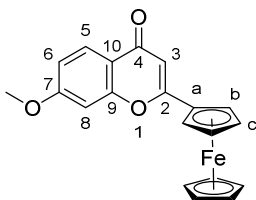
(Z)-4,6-Dihydroxy-2-ferrocenylidene-benzofuran-3-one (57c). The crude was prepared according to general procedure B starting from 4,6-dihydroxyacetophenone (500 mg, 3 mmol) and was purified by flash silica column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (8:2 to 5:5) as eluent to afford **57c** as a violet solid (26.5 mg, 3%). $C_{19}H_{14}FeO_4$. **m.p.** 174-175°C. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 4.17 (s, 5H, C_5H_5), 4.50 (s, 2H, H_c), 4.81 (s, 2H, H_b), 6.00 (s, 1H, H_5 or H_7), 6.14 (s, 1H, H_5 or H_7), 6.47 (s, 1H, H_{10}). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 69.5 (C_b), 70.6 (C_5H_5), 70.7 (C_c), 75.5 (C_a), 90.4 (C_5 or C_7), 97.5 (C_5 or C_7), 103.3 (C_9), 110.5 (C_{10}), 146.6 (C_2), 158.2 (C_4 or C_6), 166.9 and 167.4 (C_4 or C_6 and C_8), 177.9 (CO). **MS** (ESI) m/z 361 $[M-H]^-$. **Anal.** Calcd for $C_{19}H_{14}FeO_4$: C, 63.00; H, 3.90. Found C, 58.60; H, 4.48.

II.2.3.3 Synthesis of ferrocenyl flavones

General procedure Z. To a solution of ferrocenyl aurone (1 equiv.) in ethanol (80 mL/mmol) was added potassium cyanide (3.8 equiv.). The resulting mixture was refluxed for 4 h. The solution was cooled to 25°C, poured into 15% sodium hydroxide and extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with water, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure.



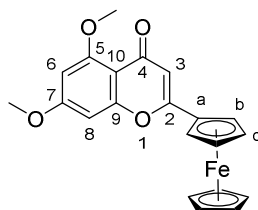
2-Ferrocenyl-chromen-4-one (58a). The crude was prepared according to general procedure Z starting from **56a** (400 mg, 1.2 mmol) and was purified by flash silica column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (8:2) as eluent to afford **58a** as a red solid (228 mg, 57%). $C_{19}H_{14}FeO_2$. **m.p.** 144-146°C. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 4.22 (s, 5H, C_5H_5), 4.63 (t, 2H, $J = 1.9$ Hz, H_c), 5.10 (t, 2H, $J = 1.9$ Hz, H_b), 6.63 (s, 1H, H_3), 7.45-7.49 (td, 1H, $J = 1.0$ Hz, $J = 8.0$ Hz, H_6), 7.69 (dd, 1H, $J = 0.7$ Hz, $J = 8.4$ Hz, H_8), 7.77-7.82 (m, 1H, H_7), 8.02 (dd, 1H, $J = 1.6$ Hz, $J = 7.9$ Hz, H_5). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 67.5 (C_b), 70.0 (C_5H_5), 71.4 (C_c), 74.6 (C_a), 105.1 (C_3), 118.1 (C_8), 123.6 (C_{10}), 124.7 and 125.1 (C_5 and C_6), 133.7 (C_7), 155.7 (C_9), 167.8 (C_2), 175.9 (CO). **MS** (ESI) m/z 331 $[M+H]^+$, 353 $[M+Na]^+$. **Anal.** Calcd for $C_{19}H_{14}FeO_2$: C, 69.12; H, 4.27. Found C, 69.17; H, 4.09.



2-Ferrocenyl-7-methoxy-chromen-4-one (58b). The crude was prepared according to general procedure Z starting from **56c** (96 mg, 0.3 mmol) and was purified by flash silica column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (85:15 to 7:3) as eluent to afford **58b** as an orange solid (48 mg, 49%). $C_{20}H_{16}FeO_3$. **m.p.** 177-178°C. 1H NMR (400 MHz,

PARTIE EXPÉRIMENTALE

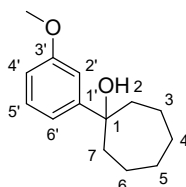
DMSO- d_6) δ 3.93 (s, 3H, OCH_3), 4.21 (s, 5H, C_5H_5), 4.60 (t, 2H, $J = 1.9$ Hz, H_c), 5.07 (t, 2H, $J = 1.9$ Hz, H_b), 6.55 (s, 1H, H_3), 7.04 (dd, 1H, $J = 2.4$ Hz, $J = 8.8$ Hz, H_6), 7.20 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz, H_8), 7.90 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz, H_5). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 56.1 (OCH_3), 67.4 (C_b), 70.1 (C_5H_5), 71.3 (C_c), 74.9 (C_a), 100.7 (C_8), 104.9 (C_3), 114.3 (C_6), 117.3 (C_{10}), 126.2 (C_5), 157.5 (C_9), 163.6 (C_7), 167.2 (C_2), 175.5 (CO). MS (ESI) m/z 361 $[M+H]^+$. Anal. Calcd for $C_{20}H_{16}FeO_3$: C, 66.68; H, 4.49. Found C, 65.55; H, 4.69.



2-Ferrocenyl-5,7-dimethoxy-chromen-4-one (58c). The crude was prepared according to general procedure Z starting from **56d** (100 mg, 0.3 mmol) and was purified by flash silica column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (6:4 to 0:100) as eluent to afford **58c** as a red solid (15 mg, 15%). $C_{21}H_{18}FeO_4$. **m.p.** 180-181°C 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 3.93 (s, 3H, OCH_3), 3.96 (s, 3H, OCH_3), 4.17 (s, 5H, C_5H_5), 4.51 (s, 2H, H_c), 4.83 (s, 2H, H_b), 5.30 (s, 1H, H_3), 6.38 (s, 1H, H_6 or H_8), 6.47 (s, 1H, H_6 or H_8). MS (ESI) m/z 391 $[M+H]^+$. HRMS m/z Calcd for $C_{21}H_{18}FeO_4$: 391.0640. Found 391.0633.

II.3. BIOMIMETIC SYNTHESIS OF TRAMADOL

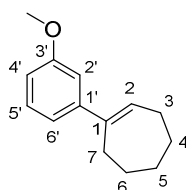
II.3.1. Synthesis of 7-(3-methoxyphenyl)-7-oxoheptanal 69



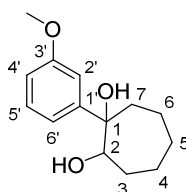
1-(3-Methoxyphenyl)cycloheptanol (66). To a solution of bromoanisole (1 g, 5.3 mmol) in anhydrous THF (10 mL) at $-78^\circ C$ was added a 2.5 M solution of n -BuLi in hexanes (2.1 mL, 5.3 mmol) and the reaction mixture was stirred at $-78^\circ C$ for 45 minutes. A solution of cycloheptanone (545 mg, 4.9 mmol) in anhydrous THF (5 mL) was added and the mixture

PARTIE EXPÉRIMENTALE

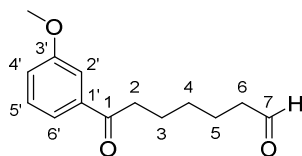
was stirred at -78°C for 2 hours. The solvents were removed under reduced pressure then the residue was diluted into distilled water and the mixture was extracted with dichloromethane. The combined organic layers were washed with water, dried over magnesium sulfate, filtered, and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by flash silica column chromatography using dichloromethane (100%) to afford **66** as a colorless oil (984 mg, 92%). $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_2$. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.55-2.10 (m, 12H, CH_2), 3.83 (s, 3H, OCH_3), 6.80 (dd, 1H, $J = 2.5$ Hz, $J = 8.0$ Hz, $H_{4'}$), 7.07-7.13 (m, 2H, $H_{2'}$, $H_{6'}$), 7.27 (t, 1H, $J = 8.0$ Hz, $H_{5'}$). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 22.8 (C_3 , C_6), 29.3 (C_4 , C_5), 43.4 (C_2 , C_7), 55.4 (OCH_3), 77.2 (C_1), 110.9 and 111.7 ($\text{C}_{2'}$, $\text{C}_{4'}$), 117.1 ($\text{C}_{6'}$), 129.4 ($\text{C}_{5'}$), 152.9 ($\text{C}_{1'}$), 159.7 ($\text{C}_{3'}$). HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_2$ 243.2972 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, found 243.1359.



1-(3-Methoxyphenyl)cyclohept-1-ene (67). To a solution of **66** (964 mg, 4.4 mmol) in dichloromethane (20 mL) was added trifluoroacetic acid (336 μL , 4.4 mmol) and the mixture was stirred at 25°C for 1 hour. The mixture was poured into water and extracted with dichloromethane. The combined organic layers were washed with water, dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to afford **67** as a yellow oil (750 mg, 95%). $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}$. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.60-1.75 (m, 4H, CH_2), 1.91 (m, 2H, CH_2), 2.36 (m, 2H, CH_2), 2.68 (m, 2H, CH_2), 3.87 (s, 3H, OCH_3), 6.19 (t, 1H, $J = 6.8$ Hz, H_2), 6.83 (ddd, 1H, $J = 1.0$ Hz, $J = 2.5$ Hz, $J = 8.0$ Hz, $H_{4'}$), 6.95 (dd, 1H, $J = 1.6$ Hz, $J = 2.5$ Hz, $H_{2'}$), 7.00 (ddd, 1H, $J = 1.0$ Hz, $J = 1.6$ Hz, $J = 8.0$ Hz, $H_{6'}$), 7.28 (t, 1H, $J = 8.0$ Hz, $H_{5'}$). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 26.9 (CH_2), 27.0 (CH_2), 28.9 (CH_2), 32.8 (CH_2), 32.9 (CH_2), 55.2 (OCH_3), 111.6 ($\text{C}_{2'}$, $\text{C}_{4'}$), 118.3 ($\text{C}_{6'}$), 130.6 and 129.1 (C_2 , $\text{C}_{5'}$), 145.0 ($\text{C}_{1'}$), 146.6 (C_1), 159.6 ($\text{C}_{3'}$). HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}$ 203.3000 $[\text{M}+\text{H}]^+$, found 203.1433, 405.5921 $[2\text{M}+\text{H}]^+$, found 405.2787.



1-(3-Methoxyphenyl)cycloheptane-1,2-diol (68). To a solution of **67** (7.28 g, 36.0 mmol) in a mixture of tetrahydrofuran (150 mL) and water (50 mL) were added a 4% aqueous solution of OsO₄ (11.5 mL) and a 50% aqueous solution of *N*-methylmorpholine-*N*-oxide (14 mL) and the mixture was stirred at 25 °C for 96 hours. A saturated aqueous solution of sodium bisulfite (50 mL) was added and the mixture was stirred at 25 °C for 30 minutes then extracted with dichloromethane. The combined organic layers were washed with water, dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by flash silica column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate (9:1) as eluant to afford **68** as a white solid (8 g, 94%). C₁₄H₂₀O₃. **m.p.** 103-104°C. **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ 1.45-2.05 (m, 10H, CH₂), 3.82 (s, 3H, OCH₃), 3.96 (dd, 1H, *J* = 2.6 Hz, *J* = 10.5 Hz, *H*₂), 6.79 (ddd, 1H, *J* = 0.8 Hz, *J* = 2.5 Hz, *J* = 8.0 Hz, *H*_{4'}), 7.04 (ddd, 1H, *J* = 0.8 Hz, *J* = 1.6 Hz, *J* = 8.0 Hz, *H*_{6'}), 7.10 (dd, 1H, *J* = 1.6 Hz, *J* = 2.5 Hz, *H*_{2'}), 7.28 (t, 1H, *J* = 8.0 Hz, *H*_{5'}). **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ 20.1 (CH₂), 22.8 (CH₂), 26.7 (CH₂), 29.8 (CH₂), 39.0 (CH₂), 55.3 (OCH₃), 77.3 (C₂), 78.9 (C₁), 111.1 and 112.0 (C_{2'}, C_{4'}), 117.0 (C_{6'}), 129.5 (C_{5'}), 150.3 (C_{1'}), 159.8 (C_{3'}). **HRMS** (ESI) *m/z* calcd for C₁₄H₂₀O₃ 259.2966 [M+Na]⁺, found 259.1304; 495.6034 [2M+Na]⁺, found 495.2717. **Anal. Calcd for C₁₄H₂₀O₃:** C, 71.14, H, 8.55. Found: C, 71.21, H, 8.70.

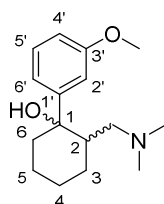


7-(3-Methoxyphenyl)-7-oxoheptanal (69). To a solution of **68** (8.00 g, 33.9 mmol) in a mixture of tetrahydrofuran (200 mL) and water (50 mL) was added sodium periodate (9.9 g, 46.3 mmol) and the mixture was stirred at 25 °C for 48 hours. The suspension was filtered and the solid was washed with ethyl acetate. The filtrate was washed with water, dried over magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by flash silica column chromatography using dichloromethane/methanol (99:1) as eluent to afford **69** as a brown oil (6.6 g, 84%). C₁₄H₁₈O₃. **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ 1.40-1.47 (m, 2H, CH₂), 1.69 (m, 2H, CH₂), 1.76 (m, 2H, CH₂), 2.47 (td, 2H, *J* = 1.7 Hz, *J* = 7.3 Hz, *H*₆), 2.97 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz, *H*₂), 3.86 (s, 3H, OCH₃), 7.10 (ddd, 1H, *J* = 0.9 Hz, *J* = 2.6 Hz, *J* = 7.9 Hz, *H*_{4'}), 7.37 (t, 1H, *J* = 7.9 Hz, *H*_{5'}), 7.48 (dd, 1H, *J* = 1.5 Hz, *J* = 2.6 Hz, *H*_{2'}), 7.53 (ddd, 1H, *J* = 0.9 Hz, *J* = 1.5 Hz, *J* = 7.9 Hz, *H*_{6'}), 9.78 (t, 1H, *J* = 1.7 Hz, *H*₇). **¹³C NMR**

(100 MHz, CDCl₃) δ 22.1 (C₅), 24.2 (C₃), 29.0 (C₄), 38.5 (C₂), 43.9 (C₆), 55.6 (OCH₃), 112.5 (C_{2'}), 119.6 (C_{4'}), 120.9 (C_{6'}), 129.8 (C_{5'}), 138.5 (C_{1'}), 160.0 (C_{3'}), 200.1 (C₁), 202.8 (C₇). **HRMS** (ESI) m/z calcd for C₁₄H₁₈O₃ 235.2988 [M+H]⁺, found 235.1335; 257.2807 [M+Na]⁺, found 257.1152.

II.3.2. Synthesis of (+/-)-tramadol and analysis of side products

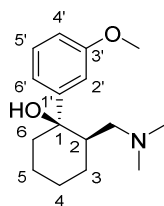
Note: tramadol extracts were analyzed at the Section of Pharmaceutical Sciences in Geneva. NMR spectroscopic data were recorded on Brüker AC-400 instrument (400 MHz) and at 400 and 500 MHz Varian Inova spectrometer.



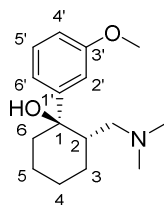
(+/-)-Tramadol. To a solution of **69** (269 mg, 1.1 mmol) in anhydrous tetrahydrofuran (86 ml) was added 2.0 M solution of diméthylamine in tetrahydrofuran (1.1 ml, 2.3 mmol) and the mixture was refluxed overnight and stirred at 25 °C for 48h. Sodium borohydride (108 mg, 2.8 mmol) or sodium cyanoborohydride (144 mg, 2.3 mmol) was then added and the resulting mixture was stirred at 25°C for 24h. Water was added and the solution was extracted with dichloromethane. The combined organic layers were washed with water, dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to afford a crude oil (241 mg) which was purified by semi-preparative HPLC. In order to localize the tramadol in the reaction mixture the crude material was analyzed by HPLC-PDA-ELSD-ESI-MS with an X-Bridge C18 column (5 μ m, 250 x 4.6 mm i.d.; Waters). Two peaks, both with [M+H]⁺ ions at m/z 264, and eluting between 16-22 min were attributed to the presence of different stereoisomers of Tramadol. This deduction was confirmed by the HPLC-PDA-ESI-MS analysis of a Tramadol standard in the same conditions. The analytical HPLC conditions were scaled-up for semi-preparative HPLC using a gradient transfer method.⁵⁰⁴ Four injections were made from a solution at 20 mg/200 μ L. A total of 13 fractions (F1-F13) were obtained from the region considered to contain the Tramadol isomers based on the LC-MS results. Fractions 1–3 yielded pure (\pm)-(1*R*,2*S*)-Tramadol and fraction 9 afforded pure (\pm)-(1*R*,2*R*)-

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Tramadol. Beside isomers of tramadol, compounds **72** and **73** were isolated and traces of opened Tramadol (**71**) was detected.



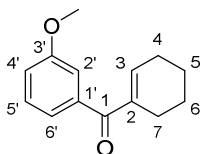
(±)-(1*R*,2*R*)-2-(Dimethylaminomethyl)-1-(3-methoxyphenyl)cyclohexanol. C₁₆H₂₅NO₂. ¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ 1.50 (qt, 1H, *J* = 3.7 Hz, *J* = 12.5 Hz, *H*_{4ax}), 1.61 (dt, 1H, *J* = 3.4 Hz, *J* = 12.8 Hz, *H*_{5eq}), 1.70 (m, 1H, *H*_{6eq}), 1.72 (m, 1H, *H*_{3ax}), 1.81 (m, 1H, *H*_{3eq}), 1.82 (m, 1H, *H*_{5ax}), 1.87 (m, 1H, *H*_{4eq}), 1.88 (m, 1H, *H*_{6ax}), 2.10 (ddt, 1H, *J* = 3.4 Hz, *J* = 9.0 Hz, *J* = 12.0 Hz, *H*₂), 2.32 (d, 1H, *J* = 13.4 Hz, *H*_{7b}), 2.40 (s, 6H, N(CH₃)₂), 2.70 (dd, 1H, *J* = 9.1 Hz, *J* = 13.4 Hz, *H*_{7a}), 3.80 (s, 3H, OCH₃), 6.81 (dd, 1H, *J* = 2.5 Hz, *J* = 7.9 Hz, *H*_{4'}), 7.05 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz, *H*_{6'}), 7.09 (d, 1H, *J* = 2.5 Hz, *H*_{2'}), 7.28 (t, 1H, *J* = 7.9 Hz, *H*_{5'}). ¹³C NMR (CD₃OD, 126 MHz) δ 22.7 (C₅), 26.6 (C₄), 27.6 (C₃), 41.9 (C₆), 43.8 (C₂), 45.3 (N(CH₃)₂), 55.6 (OCH₃), 62.1 (C₇), 76.4 (C₁), 112.3 (C_{2'}), 112.7 (C_{4'}), 118.3 (C_{6'}), 130.4 (C_{5'}), 151.1 (C_{1'}), 161.3 (C_{3'}). HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₁₆H₂₅NO₂ 264.1964 [M+H]⁺, found 264.1951.



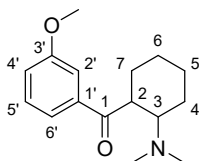
(±)-(1*R*,2*S*)-2-(Dimethylaminomethyl)-1-(3-methoxyphenyl)cyclohexanol. C₁₆H₂₅NO₂. ¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ 1.60 (m, 1H, *H*_{4eq}), 1.63 (m, 1H, *H*_{3eq}), 1.66 (m, 1H, *H*_{4ax}), 1.69 (m, 1H, *H*_{5eq}), 1.82 (m, 1H, *H*_{6eq}), 1.86 (m, 1H, *H*_{5ax}), 2.05 (m, 1H, *H*_{3ax}), 2.07 (m, 1H, *H*_{6ax}), 2.19 (dq, 1H, *J* = 5.0 Hz, *J* = 9.0 Hz, *H*₂), 2.42 (dd, 1H, *J* = 5.0 Hz, *J* = 13.1 Hz, *H*_{7b}), 2.58 (s, 6H, N(CH₃)₂), 3.04 (dd, 1H, *J* = 9.0 Hz, *J* = 13.1 Hz, *H*_{7a}), 3.81 (s, 3H, OCH₃), 6.88 (ddd, 1H, *J* = 0.9 Hz, *J* = 2.5 Hz, *J* = 8.1 Hz, *H*_{4'}), 7.12 (m, 1H, *H*_{6'}), 7.15 (m, 1H, *H*_{2'}), 7.31 (t, 1H, *J* = 8.1 Hz, *H*_{5'}). ¹³C NMR (CD₃OD, 126 MHz) δ 22.2 (C₄), 22.3 (C₅), 25.3 (C₃), 35.8 (C₆), 43.3 (C₂), 44.1 (N(CH₃)₂), 55.5 (OCH₃), 59.9 (C₇), 74.9 (C₁), 113.2 (C_{4'}), 113.4 (C_{2'}), 119.3 (C_{6'}),

PARTIE EXPÉRIMENTALE

130.3 (C_{5'}), 148.9 (C_{1'}), 161.2 (C_{3'}). **HRMS** (ESI) m/z calcd for C₁₆H₂₅NO₂ 264.1964, found 264.1951 [M+H]⁺.



Cyclohexen-1-yl-(3-methoxyphenyl)methanone (72). C₁₄H₁₆O₂. **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 1.69 (m, 2H, H₅), 1.75 (m, 2H, H₆), 2.30 (m, 2H, H₄), 2.37 (m, 2H, H₇), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 6.63 (tt, 1H, $J = 1.7$ Hz, $J = 3.8$ Hz, H₃), 7.10 (ddd, 1H, $J = 1.1$ Hz, $J = 2.5$ Hz, $J = 7.8$ Hz, H_{4'}), 7.12 (d, 1H, $J = 2.5$ Hz, H_{2'}), 7.15 (dt, 1H, $J = 1.1$ Hz, $J = 7.8$ Hz, H_{6'}), 7.35 (t, 1H, $J = 7.8$ Hz, H_{5'}). **¹³C NMR** (126 MHz, CD₃OD) δ 22.5 (C₅), 22.9 (C₆), 24.7 (C₇), 26.8 (C₄), 55.7 (OCH₃), 114.8 (C_{2'}), 118.2 (C_{4'}), 122.3 (C_{6'}), 130.1 (C_{5'}), 139.5 (C₂), 141.0 (C_{1'}), 146.1 (C₃), 160.8 (C_{3'}), 199.8 (C₁). **HRMS** (ESI) m/z calcd for C₁₄H₁₆O₂ 217.1229, found 217.1220 [M+H]⁺.



[2-(Dimethylamino)cyclohexyl]-(3-methoxyphenyl)methanone (73). C₁₆H₂₃NO₂. **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 1.37 (m, 1H, H_{5b}), 1.38 (m, 1H, H_{4b}), 1.39 (m, 1H, H_{6b}), 1.45 (m, 1H, H_{7b}), 1.77 (m, 1H, H_{6a}), 1.91 (m, 1H, H_{5a}), 1.96 (m, 1H, H_{4a}), 2.00 (m, 1H, H_{7a}), 2.31 (s, 6H, N(CH₃)₂), 3.16 (td, 1H, $J = 3.0$ Hz, $J = 11.0$ Hz, H₃), 3.71 (td, 1H, $J = 3.9$ Hz, $J = 11.0$ Hz, H₂), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 7.19 (ddd, 1H, $J = 1.2$ Hz, $J = 2.6$ Hz, $J = 8.0$ Hz, H_{4'}), 7.43 (t, 1H, $J = 8.0$ Hz, H_{5'}), 7.52 (dd, 1H, $J = 1.2$ Hz, $J = 2.6$ Hz, H_{2'}), 7.64 (dt, 1H, $J = 1.2$ Hz, $J = 8.0$ Hz, H_{6'}). **¹³C NMR** (126 MHz, CD₃OD) δ 23.6 (C₃), 26.0 (C₅), 26.2 (C₆), 32.4 (C₄), 40.8 (N(CH₃)₂), 48.6 (C₂), 55.7 (OCH₃), 65.8 (C₃), 113.8 (C_{2'}), 120.2 (C_{4'}), 121.7 (C_{6'}), 130.7 (C_{5'}), 139.1 (C_{1'}), 161.4 (C_{3'}), 204.8 (C₁). **HRMS** (ESI) m/z calcd for C₁₆H₂₃NO₂ 262.1807, found 262.1797 [M+H]⁺.

III. Analysis of tramadol

III.1. UHPLC-PDA-ESI-MS ANALYSIS OF TRAMADOL

UHPLC-TOF-MS analyses were performed on a Waters Acquity UPLC system coupled to a Waters Micromass-LCT Premier Time of Flight Mass spectrometer (Milford, MA, USA), equipped with an electrospray interface (ESI). Compound separations were performed on a C18 column (Waters Acquity UPLC BEH C18, 150 mm x 2.1 mm i.d.; 1.7 μ m, Waters, Milford, MA, USA). The mobile phase consisted of H₂O (A) and acetonitrile (B), each containing 0.1% formic acid (v/v). For high resolution detection, the following gradient was used: from 5–95% B in 30 min at a flow rate of 460 μ L. The auto sampler and the column oven were set at 10 and 40°C, respectively. Injection volume was 2 μ L. Detection was performed in positive ionization mode in the 100–1300 Da range with acquisition times of 0.3 sec in W-mode. The ESI conditions were set as follows: capillary voltage 2400 V, cone voltage 40 V, source temperature 120°C, desolvation temperature 300°C, cone gas flow 20 L/h, desolvation gas flow 800 L/h, and MCP (micro channel plate) detector voltage 2500 V.

III.2. SEMI-PREPARATIVE HPLC-UV ISOLATION FOR ANALYSIS OF TRAMADOL

HPLC-UV preparative analysis was performed with an Armen modular spot prep II (Saint-Avé, France), equipped with a UV detector. The HPLC conditions were as follows: X-Bridge C18 column (5 μ m, 250 x 19 mm i.d.; Waters); solvent system: CH₃CN-H₂O, both containing 0.1% formic acid; gradient mode: 5% to 30% CH₃CN in 40 min, 40% to 100% CH₃CN in 5 min and 100% CH₃CN in 5 min; flow rate: 15 mL/min; injection volume: 200 μ L; sample concentration: 20 mg/mL in MeOH. The UV absorbance was measured at 210 and 254 nm. 13 fractions were collected in the zone supposed to contain the Tramadol.

BIBLIOGRAPHIE

I. Valorisation des travaux de thèse

I.1. PUBLICATIONS

Lecerf-Schmidt F., Peres B., Valdameri G., Gauthier C., Winter E., Payen L., Di Pietro A., Boumendjel A., ABCG2 recent discovery of potent and highly selective inhibitors. *Future Med Chem.* **2013**, 5, 1037-1045.

Manzano J. I., Lecerf-Schmidt F., Lespinasse M-A, Di Pietro A., Castanys S., Boumendjel A., Gamarro F.. Identification of specific reversal agents for Leishmania ABCI4-mediated antimony resistance by flavonoid and trolox derivative screening. *J. Antimicrob. Chemother.* **2013**, 69, 664-672.

Winter E., Lecerf-Schmidt F., Gozzi G., Peres B., Lightbody M., Gauthier C., Ozvegy-Laczka C., Szakacs G., Sarkadi B., Creczynski-Pasa T.B., Boumendjel A., Di Pietro A. Structure-activity relationships of chromone derivatives toward mechanism of interaction with, and inhibition of, breast cancer resistance protein ABCG2. *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 9849-9860.

Lorendeau D., Dury L., Genoux-Bastide E., Lecerf-Schmidt F., Simões-Pires C., Carrupt P-A., Terreux R., Magnard S., Di Pietro A., Boumendjel A., Baubichon-Cortay H. Collateral sensitivity of resistant MRP1-overexpressing cells to flavonoids and derivatives through GSH efflux. *Biochemical Pharmacology.* **2014**, 90, 235–245.

Honorat M., Guitton J., Gauthier C., Bouard C., Lecerf-Schmidt F., Peres B., Terreux R., Gervot H., Rioufol C., Boumendjel A., Puisieux A., Di Pietro A., Payen L. MBL-II-141, a chromone derivative, enhances irinotecan (CPT-11) anticancer efficiency in ABCG2-positive xenografts. *Oncotarget.* **2014**, 5, 11957-11970.

BIBLIOGRAPHIE

Romek K.M., Nun P., Remaud G.S., Silvestre V., Taiwe G.S., Lecerf-Schmidt F., Boumendjel A., De Waard M., Robins R.J. A retro-biosynthetic approach to the prediction of biosynthetic pathways from position-specific isotope analysis as shown for tramadol. *P.N.A.S.* **2015**, 112, 8296-8301.

Lecerf-Schmidt F., Haudecoeur R., Peres B., Ferreira Queiroz M.M., Marcourt L., Challal S., Ferreira Queiroz E., Taiwe G.S., Lomberget T., Le Borgne M., Wolfender J-L., De Waard M., Robins R.J., Boumendjel A. Biomimetic synthesis of tramadol. *Chem. Commun.* **2015** (DOI: 10.1039/C5CC05948H).

A. McGhee, How could a tree make tramadol? *Chemistry World.* **2015**

I.2. COMMUNICATIONS ORALES

Discovery of highly potent, selective and safe reversers of BCRP-mediated multidrug resistance, 27^{ème} Journées Franco-belges de Pharmacochimie (Lille, 2013).

Inhibitors of the Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) transporter: design, synthesis and biological evaluation, RECOB (Rencontre en Chimie Organique Biologique 15 (Aussois, 2014).

I.3. POSTERS

Inhibitors of the Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) transporter: design, synthesis and biological evaluation, 20^{ème} Journées des Jeunes Chercheurs de la SCT (Paris, 2013), 49^{ème} RICT (Nice, 2013), Drug Discovery and Therapy World Congress (Boston, 2014).

Elucidation of ABCG2 inhibitor-binding sites through a pharmacophore-based approach, Frontiers in Medicinal Chemistry (Anvers, 2015).

II. Notes et références

1. Lagarce, L.; Zenut, M.; Laine-Cessac, P., [Methotrexate pharmacology]. *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. (Paris)* **2015**, *44*, 203-11.
2. Pommier, Y.; Leo, E.; Zhang, H.; Marchand, C., DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 421-33.
3. Goodsell, D. S., The molecular perspective: Cisplatin. *Stem Cells* **2006**, *24*, 514-5.
4. Wojcik, K.; Zarebski, M.; Cossarizza, A.; Dobrucki, J. W., Daunomycin, an antitumor DNA intercalator, influences histone-DNA interactions. *Cancer Biol. Ther.* **2013**, *14*, 823-32.
5. Jordan, M. A., Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin. *Current medicinal chemistry. Anti-cancer agents* **2002**, *2*, 1-17.
6. Schiff, P. B.; Fant, J.; Horwitz, S. B., Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* **1979**, *277*, 665-7.
7. Ringel, I.; Horwitz, S. B., Studies with RP 56976 (taxotere): a semisynthetic analogue of taxol. *J. Natl. Cancer. Inst.* **1991**, *83*, 288-91.
8. Boutayeb, S.; Zakkouri, F. Z.; Aitelhaj, M.; Mesmoudi, M.; Boutayeb, A.; Boutayeb, W.; Mrabti, H.; Errihani, H., [Protein tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy]. *Pathol. Biol.* **2012**, *60*, 229-33.
9. Gillet, J. P.; Gottesman, M. M., Overcoming multidrug resistance in cancer: 35 years after the discovery of ABCB1. *Drug Resist Updat* **2012**, *15*, 2-4.
10. Guengerich, F. P., Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *The AAPS journal* **2006**, *8*, E101-11.
11. Marre, F.; Sanderink, G. J.; de Sousa, G.; Gaillard, C.; Martinet, M.; Rahmani, R., Hepatic biotransformation of docetaxel (Taxotere) in vitro: involvement of the CYP3A subfamily in humans. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 1296-302.
12. Engels, F. K.; Ten Tije, A. J.; Baker, S. D.; Lee, C. K.; Loos, W. J.; Vulto, A. G.; Verweij, J.; Sparreboom, A., Effect of cytochrome P450 3A4 inhibition on the pharmacokinetics of docetaxel. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2004**, *75*, 448-54.
13. Garcia-Martin, E.; Pizarro, R. M.; Martinez, C.; Gutierrez-Martin, Y.; Perez, G.; Jover, R.; Agundez, J. A., Acquired resistance to the anticancer drug paclitaxel is associated with induction of cytochrome P450 2C8. *Pharmacogenomics* **2006**, *7*, 575-85.
14. Backos, D. S.; Franklin, C. C.; Reigan, P., The role of glutathione in brain tumor drug resistance. *Biochem. Pharmacol.* **2012**, *83*, 1005-12.
15. Hao, X. Y.; Bergh, J.; Brodin, O.; Hellman, U.; Mannervik, B., Acquired resistance to cisplatin and doxorubicin in a small cell lung cancer cell line is correlated to elevated expression of glutathione-linked detoxification enzymes. *Carcinogenesis* **1994**, *15*, 1167-73.
16. Nitiss, J. L.; Vilalta, P. M.; Wu, H.; McMahon, J., Mutations in the gyrB domain of eukaryotic topoisomerase II can lead to partially dominant resistance to etoposide and amsacrine. *Mol. Pharmacol.* **1994**, *46*, 773-7.
17. Levine, A. J., p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **1997**, *88*, 323-31.
18. Walton, M. I.; Whysong, D.; O'Connor, P. M.; Hockenbery, D.; Korsmeyer, S. J.; Kohn, K. W., Constitutive expression of human Bcl-2 modulates nitrogen mustard and camptothecin induced apoptosis. *Cancer Res.* **1993**, *53*, 1853-61.

19. Allouche, M.; Bettaieb, A.; Vindis, C.; Rousse, A.; Grignon, C.; Laurent, G., Influence of Bcl-2 overexpression on the ceramide pathway in daunorubicin-induced apoptosis of leukemic cells. *Oncogene* **1997**, *14*, 1837-45.
20. Lucibello, M.; Gambacurta, A.; Zonfrillo, M.; Pierimarchi, P.; Serafino, A.; Rasi, G.; Rubartelli, A.; Garaci, E., TCTP is a critical survival factor that protects cancer cells from oxidative stress-induced cell-death. *Exp. Cell Res.* **2011**, *317*, 2479-89.
21. Higgins, C. F.; Hiles, I. D.; Salmond, G. P.; Gill, D. R.; Downie, J. A.; Evans, I. J.; Holland, I. B.; Gray, L.; Buckel, S. D.; Bell, A. W.; et al., A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature* **1986**, *323*, 448-50.
22. Blattner, F. R.; Plunkett, G., 3rd; Bloch, C. A.; Perna, N. T.; Burland, V.; Riley, M.; Collado-Vides, J.; Glasner, J. D.; Rode, C. K.; Mayhew, G. F.; Gregor, J.; Davis, N. W.; Kirkpatrick, H. A.; Goeden, M. A.; Rose, D. J.; Mau, B.; Shao, Y., The complete genome sequence of Escherichia coli K-12. *Science* **1997**, *277*, 1453-62.
23. Kang, J.; Park, J.; Choi, H.; Burla, B.; Kretzschmar, T.; Lee, Y.; Martinoia, E., Plant ABC Transporters. *Arabidopsis Book* **2011**, *9*, e0153.
24. Dean, M.; Hamon, Y.; Chimini, G., The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J. Lipid Res.* **2001**, *42*, 1007-17.
25. Biemans-Oldehinkel, E.; Doeven, M. K.; Poolman, B., ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains. *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 1023-35.
26. Rees, D. C.; Johnson, E.; Lewinson, O., ABC transporters: the power to change. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, *10*, 218-27.
27. ter Beek, J.; Guskov, A.; Slotboom, D. J., Structural diversity of ABC transporters. *J. Gen. Physiol.* **2014**, *143*, 419-35.
28. Dawson, R. J.; Locher, K. P., Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. *Nature* **2006**, *443*, 180-5.
29. Chen, J., Molecular mechanism of the Escherichia coli maltose transporter. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2013**, *23*, 492-8.
30. Oldham, M. L.; Chen, J., Snapshots of the maltose transporter during ATP hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 15152-6.
31. Loo, T. W.; Bartlett, M. C.; Clarke, D. M., Simultaneous binding of two different drugs in the binding pocket of the human multidrug resistance P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 39706-10.
32. Li, J.; Jaimes, K. F.; Aller, S. G., Refined structures of mouse P-glycoprotein. *Protein Sci.* **2014**, *23*, 34-46.
33. Hung, L. W.; Wang, I. X.; Nikaido, K.; Liu, P. Q.; Ames, G. F.; Kim, S. H., Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter. *Nature* **1998**, *396*, 703-7.
34. Hopfner, K. P.; Karcher, A.; Shin, D. S.; Craig, L.; Arthur, L. M.; Carney, J. P.; Tainer, J. A., Structural biology of Rad50 ATPase: ATP-driven conformational control in DNA double-strand break repair and the ABC-ATPase superfamily. *Cell* **2000**, *101*, 789-800.
35. Smith, P. C.; Karpowich, N.; Millen, L.; Moody, J. E.; Rosen, J.; Thomas, P. J.; Hunt, J. F., ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer. *Mol. Cell* **2002**, *10*, 139-49.
36. George, A. M.; Jones, P. M., Perspectives on the structure-function of ABC transporters: the Switch and Constant Contact models. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2012**, *109*, 95-107.
37. Walker, J. E.; Saraste, M.; Runswick, M. J.; Gay, N. J., Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* **1982**, *1*, 945-51.

38. Chen, J.; Lu, G.; Lin, J.; Davidson, A. L.; Quioco, F. A., A tweezers-like motion of the ATP-binding cassette dimer in an ABC transport cycle. *Mol. Cell* **2003**, *12*, 651-61.
39. Holland, I. B.; Blight, M. A., ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. *J. Mol. Biol.* **1999**, *293*, 381-99.
40. Locher, K. P.; Lee, A. T.; Rees, D. C., The E. coli BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science* **2002**, *296*, 1091-8.
41. Pinkett, H. W.; Lee, A. T.; Lum, P.; Locher, K. P.; Rees, D. C., An inward-facing conformation of a putative metal-chelate-type ABC transporter. *Science* **2007**, *315*, 373-7.
42. Ward, A.; Reyes, C. L.; Yu, J.; Roth, C. B.; Chang, G., Flexibility in the ABC transporter MsbA: Alternating access with a twist. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 19005-10.
43. Oldham, M. L.; Chen, J., Crystal structure of the maltose transporter in a pretranslocation intermediate state. *Science* **2011**, *332*, 1202-5.
44. Oldham, M. L.; Khare, D.; Quioco, F. A.; Davidson, A. L.; Chen, J., Crystal structure of a catalytic intermediate of the maltose transporter. *Nature* **2007**, *450*, 515-21.
45. Hollenstein, K.; Frei, D. C.; Locher, K. P., Structure of an ABC transporter in complex with its binding protein. *Nature* **2007**, *446*, 213-6.
46. Gerber, S.; Comellas-Bigler, M.; Goetz, B. A.; Locher, K. P., Structural basis of trans-inhibition in a molybdate/tungstate ABC transporter. *Science* **2008**, *321*, 246-50.
47. Kadaba, N. S.; Kaiser, J. T.; Johnson, E.; Lee, A.; Rees, D. C., The high-affinity E. coli methionine ABC transporter: structure and allosteric regulation. *Science* **2008**, *321*, 250-3.
48. Hohl, M.; Briand, C.; Grutter, M. G.; Seeger, M. A., Crystal structure of a heterodimeric ABC transporter in its inward-facing conformation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2012**, *19*, 395-402.
49. Choudhury, H. G.; Tong, Z.; Mathavan, I.; Li, Y.; Iwata, S.; Zirah, S.; Rebuffat, S.; van Veen, H. W.; Beis, K., Structure of an antibacterial peptide ATP-binding cassette transporter in a novel outward occluded state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111*, 9145-50.
50. Jin, M. S.; Oldham, M. L.; Zhang, Q.; Chen, J., Crystal structure of the multidrug transporter P-glycoprotein from *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **2012**, *490*, 566-9.
51. Srinivasan, V.; Pierik, A. J.; Lill, R., Crystal structures of nucleotide-free and glutathione-bound mitochondrial ABC transporter Atm1. *Science* **2014**, *343*, 1137-40.
52. Lee, J. Y.; Yang, J. G.; Zhitnitsky, D.; Lewinson, O.; Rees, D. C., Structural basis for heavy metal detoxification by an Atm1-type ABC exporter. *Science* **2014**, *343*, 1133-6.
53. Shintre, C. A.; Pike, A. C.; Li, Q.; Kim, J. I.; Barr, A. J.; Goubin, S.; Shrestha, L.; Yang, J.; Berridge, G.; Ross, J.; Stansfeld, P. J.; Sansom, M. S.; Edwards, A. M.; Bountra, C.; Marsden, B. D.; von Delft, F.; Bullock, A. N.; Gileadi, O.; Burgess-Brown, N. A.; Carpenter, E. P., Structures of ABCB10, a human ATP-binding cassette transporter in apo- and nucleotide-bound states. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*, 9710-5.
54. Aller, S. G.; Yu, J.; Ward, A.; Weng, Y.; Chittaboina, S.; Zhuo, R.; Harrell, P. M.; Trinh, Y. T.; Zhang, Q.; Urbatsch, I. L.; Chang, G., Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science* **2009**, *323*, 1718-22.
55. Kodan, A.; Yamaguchi, T.; Nakatsu, T.; Sakiyama, K.; Hipolito, C. J.; Fujioka, A.; Hirokane, R.; Ikeguchi, K.; Watanabe, B.; Hiratake, J.; Kimura, Y.; Suga, H.; Ueda, K.; Kato, H., Structural basis for gating mechanisms of a eukaryotic P-glycoprotein homolog. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111*, 4049-54.

56. Jones, P. M.; George, A. M., Opening of the ADP-bound active site in the ABC transporter ATPase dimer: evidence for a constant contact, alternating sites model for the catalytic cycle. *Proteins* **2009**, *75*, 387-96.
57. Jones, P. M.; George, A. M., A reciprocating twin-channel model for ABC transporters. *Q. Rev. Biophys.* **2014**, *47*, 189-220.
58. Higgins, C. F.; Linton, K. J., The ATP switch model for ABC transporters. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 918-26.
59. Linton, K. J.; Higgins, C. F., Structure and function of ABC transporters: the ATP switch provides flexible control. *Pflugers Arch.* **2007**, *453*, 555-67.
60. Moeller, A.; Lee, S. C.; Tao, H.; Speir, J. A.; Chang, G.; Urbatsch, I. L.; Potter, C. S.; Carragher, B.; Zhang, Q., Distinct conformational spectrum of homologous multidrug ABC transporters. *Structure* **2015**, *23*, 450-60.
61. Abuznait, A. H.; Kaddoumi, A., Role of ABC transporters in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *ACS Chem. Neurosci.* **2012**, *3*, 820-31.
62. Liao, Y. C.; Lee, W. J.; Hwang, J. P.; Wang, Y. F.; Tsai, C. F.; Wang, P. N.; Wang, S. J.; Fuh, J. L., ABCA7 gene and the risk of Alzheimer's disease in Han Chinese in Taiwan. *Neurobiol. Aging* **2014**, *35*, 2423 e7-2423 e13.
63. Brooks-Wilson, A.; Marcil, M.; Clee, S. M.; Zhang, L. H.; Roomp, K.; van Dam, M.; Yu, L.; Brewer, C.; Collins, J. A.; Molhuizen, H. O.; Loubser, O.; Ouelette, B. F.; Fichter, K.; Ashbourne-Excoffon, K. J.; Sensen, C. W.; Scherer, S.; Mott, S.; Denis, M.; Martindale, D.; Frohlich, J.; Morgan, K.; Koop, B.; Pimstone, S.; Kastelein, J. J.; Genest, J., Jr.; Hayden, M. R., Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat. Genet.* **1999**, *22*, 336-45.
64. Rust, S.; Rosier, M.; Funke, H.; Real, J.; Amoura, Z.; Piette, J. C.; Deleuze, J. F.; Brewer, H. B.; Duverger, N.; Deneffe, P.; Assmann, G., Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat. Genet.* **1999**, *22*, 352-5.
65. Chen, P.; Dai, Y.; Wu, X.; Wang, Y.; Sun, S.; Xiao, J.; Zhang, Q.; Guan, L.; Zhao, X.; Hao, X.; Wu, R.; Xie, L., Mutations in the ABCA3 gene are associated with cataract-microcornea syndrome. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2014**, *55*, 8031-43.
66. Allikmets, R.; Singh, N.; Sun, H.; Shroyer, N. F.; Hutchinson, A.; Chidambaram, A.; Gerrard, B.; Baird, L.; Stauffer, D.; Peiffer, A.; Rattner, A.; Smallwood, P.; Li, Y.; Anderson, K. L.; Lewis, R. A.; Nathans, J.; Leppert, M.; Dean, M.; Lupski, J. R., A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. *Nat. Genet.* **1997**, *15*, 236-46.
67. Akiyama, M., ABCA12 mutations and autosomal recessive congenital ichthyosis: a review of genotype/phenotype correlations and of pathogenetic concepts. *Hum. Mutat.* **2010**, *31*, 1090-6.
68. Goldsmith, T.; Fuchs-Telem, D.; Israeli, S.; Sarig, O.; Padalon-Brauch, G.; Bergman, R.; Indelman, M.; Sprecher, E.; Nussbeck, J., The sound of silence: autosomal recessive congenital ichthyosis caused by a synonymous mutation in ABCA12. *Exp. Dermatol.* **2013**, *22*, 251-4.
69. Knight, H. M.; Pickard, B. S.; Maclean, A.; Malloy, M. P.; Soares, D. C.; McRae, A. F.; Condie, A.; White, A.; Hawkins, W.; McGhee, K.; van Beck, M.; MacIntyre, D. J.; Starr, J. M.; Deary, I. J.; Visscher, P. M.; Porteous, D. J.; Cannon, R. E.; St Clair, D.; Muir, W. J.; Blackwood, D. H., A cytogenetic abnormality and rare coding variants identify ABCA13 as a candidate gene in schizophrenia, bipolar disorder, and depression. *Am. J. Hum. Genet.* **2009**, *85*, 833-46.

70. Momburg, F.; Roelse, J.; Howard, J. C.; Butcher, G. W.; Hammerling, G. J.; Neefjes, J. J., Selectivity of MHC-encoded peptide transporters from human, mouse and rat. *Nature* **1994**, *367*, 648-51.
71. Powis, S. J.; Townsend, A. R.; Deverson, E. V.; Bastin, J.; Butcher, G. W.; Howard, J. C., Restoration of antigen presentation to the mutant cell line RMA-S by an MHC-linked transporter. *Nature* **1991**, *354*, 528-31.
72. de Vree, J. M.; Jacquemin, E.; Sturm, E.; Cresteil, D.; Bosma, P. J.; Aten, J.; Deleuze, J. F.; Desrochers, M.; Burdelski, M.; Bernard, O.; Oude Elferink, R. P.; Hadchouel, M., Mutations in the MDR3 gene cause progressive familial intrahepatic cholestasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 282-7.
73. Strautnieks, S. S.; Bull, L. N.; Knisely, A. S.; Kocoshis, S. A.; Dahl, N.; Arnell, H.; Sokal, E.; Dahan, K.; Childs, S.; Ling, V.; Tanner, M. S.; Kagalwalla, A. F.; Nemeth, A.; Pawlowska, J.; Baker, A.; Mieli-Vergani, G.; Freimer, N. B.; Gardiner, R. M.; Thompson, R. J., A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nat. Genet.* **1998**, *20*, 233-8.
74. Zhang, C.; Li, D.; Zhang, J.; Chen, X.; Huang, M.; Archacki, S.; Tian, Y.; Ren, W.; Mei, A.; Zhang, Q.; Fang, M.; Su, Z.; Yin, Y.; Liu, D.; Chen, Y.; Cui, X.; Li, C.; Yang, H.; Wang, Q.; Wang, J.; Liu, M.; Deng, Y., Mutations in ABCB6 cause dyschromatosis universalis hereditaria. *J. Invest. Dermatol.* **2013**, *133*, 2221-8.
75. Allikmets, R.; Raskind, W. H.; Hutchinson, A.; Schueck, N. D.; Dean, M.; Koeller, D. M., Mutation of a putative mitochondrial iron transporter gene (ABC7) in X-linked sideroblastic anemia and ataxia (XLSA/A). *Hum. Mol. Genet.* **1999**, *8*, 743-9.
76. Paulusma, C. C.; Bosma, P. J.; Zaman, G. J.; Bakker, C. T.; Otter, M.; Scheffer, G. L.; Scheper, R. J.; Borst, P.; Oude Elferink, R. P., Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene. *Science* **1996**, *271*, 1126-8.
77. Ringpfeil, F.; Lebowohl, M. G.; Uitto, J., Abstracts: mutations in the MRP6 gene cause pseudoxanthoma elasticum. *J. Invest. Dermatol.* **2000**, *115*, 332.
78. Cant, N.; Pollock, N.; Ford, R. C., CFTR structure and cystic fibrosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2014**, *52*, 15-25.
79. Bryan, J.; Aguilar-Bryan, L., Sulfonylurea receptors: ABC transporters that regulate ATP-sensitive K(+) channels. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1461*, 285-303.
80. Thomas, P. M.; Cote, G. J.; Wohllk, N.; Haddad, B.; Mathew, P. M.; Rabl, W.; Aguilar-Bryan, L.; Gagel, R. F.; Bryan, J., Mutations in the sulfonylurea receptor gene in familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Science* **1995**, *268*, 426-9.
81. Watkins, P. A.; Gould, S. J.; Smith, M. A.; Braiterman, L. T.; Wei, H. M.; Kok, F.; Moser, A. B.; Moser, H. W.; Smith, K. D., Altered expression of ALDP in X-linked adrenoleukodystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* **1995**, *57*, 292-301.
82. Gartner, J.; Moser, H.; Valle, D., Mutations in the 70K peroxisomal membrane protein gene in Zellweger syndrome. *Nat. Genet.* **1992**, *1*, 16-23.
83. Dehghan, A.; Kottgen, A.; Yang, Q.; Hwang, S. J.; Kao, W. L.; Rivadeneira, F.; Boerwinkle, E.; Levy, D.; Hofman, A.; Astor, B. C.; Benjamin, E. J.; van Duijn, C. M.; Witteman, J. C.; Coresh, J.; Fox, C. S., Association of three genetic loci with uric acid concentration and risk of gout: a genome-wide association study. *Lancet* **2008**, *372*, 1953-61.
84. Kolz, M.; Johnson, T.; Sanna, S.; Teumer, A.; Vitart, V.; Perola, M.; Mangino, M.; Albrecht, E.; Wallace, C.; Farrall, M.; Johansson, A.; Nyholt, D. R.; Aulchenko, Y.; Beckmann, J. S.; Bergmann, S.; Bochud, M.; Brown, M.; Campbell, H.; Consortium, E.; Connell, J.; Dominiczak, A.; Homuth, G.; Lamina, C.; McCarthy, M. I.; Consortium, E.; Meitinger, T.; Mooser, V.; Munroe, P.; Nauck, M.; Peden, J.; Prokisch, H.; Salo, P.; Salomaa, V.; Samani, N. J.; Schlessinger, D.; Uda, M.; Volker, U.; Waeber, G.; Waterworth, D.; Wang-

- Sattler, R.; Wright, A. F.; Adamski, J.; Whitfield, J. B.; Gyllenstein, U.; Wilson, J. F.; Rudan, I.; Pramstaller, P.; Watkins, H.; Consortium, P.; Doering, A.; Wichmann, H. E.; Study, K.; Spector, T. D.; Peltonen, L.; Volzke, H.; Nagaraja, R.; Vollenweider, P.; Caulfield, M.; Wtccc; Illig, T.; Gieger, C., Meta-analysis of 28,141 individuals identifies common variants within five new loci that influence uric acid concentrations. *PLoS Genet.* **2009**, *5*, e1000504.
85. Berge, K. E.; Tian, H.; Graf, G. A.; Yu, L.; Grishin, N. V.; Schultz, J.; Kwiterovich, P.; Shan, B.; Barnes, R.; Hobbs, H. H., Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science* **2000**, *290*, 1771-5.
86. Lee, M. H.; Lu, K.; Patel, S. B., Genetic basis of sitosterolemia. *Curr. Opin. Lipidol.* **2001**, *12*, 141-9.
87. Gottesman, M. M.; Fojo, T.; Bates, S. E., Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nature reviews. Cancer* **2002**, *2*, 48-58.
88. Dano, K., Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1973**, *323*, 466-83.
89. Juliano, R. L.; Ling, V., A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta* **1976**, *455*, 152-62.
90. Cole, S. P.; Bhardwaj, G.; Gerlach, J. H.; Mackie, J. E.; Grant, C. E.; Almquist, K. C.; Stewart, A. J.; Kurz, E. U.; Duncan, A. M.; Deeley, R. G., Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* **1992**, *258*, 1650-4.
91. Chen, Z. S.; Tiwari, A. K., Multidrug resistance proteins (MRPs/ABCCs) in cancer chemotherapy and genetic diseases. *FEBS J.* **2011**, *278*, 3226-45.
92. Doyle, L. A.; Yang, W.; Abruzzo, L. V.; Krogmann, T.; Gao, Y.; Rishi, A. K.; Ross, D. D., A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1998**, *95*, 15665-70.
93. Allikmets, R.; Schriml, L. M.; Hutchinson, A.; Romano-Spica, V.; Dean, M., A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 5337-9.
94. Miyake, K.; Mickley, L.; Litman, T.; Zhan, Z.; Robey, R.; Cristensen, B.; Brangi, M.; Greenberger, L.; Dean, M.; Fojo, T.; Bates, S. E., Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 8-13.
95. Tsuruo, T.; Iida, H.; Tsukagoshi, S.; Sakurai, Y., Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res.* **1981**, *41*, 1967-72.
96. Tsuruo, T.; Iida, H.; Tsukagoshi, S.; Sakurai, Y., Increased accumulation of vincristine and adriamycin in drug-resistant P388 tumor cells following incubation with calcium antagonists and calmodulin inhibitors. *Cancer Res.* **1982**, *42*, 4730-3.
97. Benson, A. B., 3rd; Trump, D. L.; Koeller, J. M.; Egorin, M. I.; Olman, E. A.; Witte, R. S.; Davis, T. E.; Tormey, D. C., Phase I study of vinblastine and verapamil given by concurrent iv infusion. *Cancer Treat. Rep.* **1985**, *69*, 795-9.
98. Twentyman, P. R.; Fox, N. E.; White, D. J., Cyclosporin A and its analogues as modifiers of adriamycin and vincristine resistance in a multi-drug resistant human lung cancer cell line. *Br. J. Cancer* **1987**, *56*, 55-7.
99. Bartlett, N. L.; Lum, B. L.; Fisher, G. A.; Brophy, N. A.; Ehsan, M. N.; Halsey, J.; Sikic, B. I., Phase I trial of doxorubicin with cyclosporine as a modulator of multidrug resistance. *J. Clin. Oncol.* **1994**, *12*, 835-42.
100. Verweij, J.; Herweijer, H.; Oosterom, R.; van der Burg, M. E.; Planting, A. S.; Seynaeve, C.; Stoter, G.; Nooter, K., A phase II study of epidoxorubicin in colorectal cancer

and the use of cyclosporin-A in an attempt to reverse multidrug resistance. *Br. J. Cancer* **1991**, *64*, 361-4.

101. Gupta, A.; Dai, Y.; Vethanayagam, R. R.; Hebert, M. F.; Thummel, K. E.; Unadkat, J. D.; Ross, D. D.; Mao, Q., Cyclosporin A, tacrolimus and sirolimus are potent inhibitors of the human breast cancer resistance protein (ABCG2) and reverse resistance to mitoxantrone and topotecan. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2006**, *58*, 374-83.

102. Twentyman, P. R.; Bleehen, N. M., Resistance modification by PSC-833, a novel non-immunosuppressive cyclosporin [corrected]. *Eur. J. Cancer* **1991**, *27*, 1639-42.

103. Dhainaut, A.; Regnier, G.; Atassi, G.; Pierre, A.; Leonce, S.; Kraus-Berthier, L.; Prost, J. F., New triazine derivatives as potent modulators of multidrug resistance. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 2481-96.

104. Giaccone, G.; Linn, S. C.; Welink, J.; Catimel, G.; Stieltjes, H.; van der Vijgh, W. J.; Eeltink, C.; Vermorken, J. B.; Pinedo, H. M., A dose-finding and pharmacokinetic study of reversal of multidrug resistance with SDZ PSC 833 in combination with doxorubicin in patients with solid tumors. *Clin. Cancer. Res.* **1997**, *3*, 2005-15.

105. Boote, D. J.; Dennis, I. F.; Twentyman, P. R.; Osborne, R. J.; Laburte, C.; Hensel, S.; Smyth, J. F.; Brampton, M. H.; Bleehen, N. M., Phase I study of etoposide with SDZ PSC 833 as a modulator of multidrug resistance in patients with cancer. *J. Clin. Oncol.* **1996**, *14*, 610-8.

106. Martin, C.; Berridge, G.; Mistry, P.; Higgins, C.; Charlton, P.; Callaghan, R., The molecular interaction of the high affinity reversal agent XR9576 with P-glycoprotein. *Br. J. Pharmacol.* **1999**, *128*, 403-11.

107. Mistry, P.; Stewart, A. J.; Dangerfield, W.; Okiji, S.; Liddle, C.; Bootle, D.; Plumb, J. A.; Templeton, D.; Charlton, P., In vitro and in vivo reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by a novel potent modulator, XR9576. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 749-58.

108. de Bruin, M.; Miyake, K.; Litman, T.; Robey, R.; Bates, S. E., Reversal of resistance by GF120918 in cell lines expressing the ABC half-transporter, MXR. *Cancer Lett.* **1999**, *146*, 117-26.

109. Cripe, L. D.; Uno, H.; Paietta, E. M.; Litzow, M. R.; Ketterling, R. P.; Bennett, J. M.; Rowe, J. M.; Lazarus, H. M.; Luger, S.; Tallman, M. S., Zosuquidar, a novel modulator of P-glycoprotein, does not improve the outcome of older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia: a randomized, placebo-controlled trial of the Eastern Cooperative Oncology Group 3999. *Blood* **2010**, *116*, 4077-85.

110. Wu, C. P.; Calcagno, A. M.; Ambudkar, S. V., Reversal of ABC drug transporter-mediated multidrug resistance in cancer cells: evaluation of current strategies. *Curr. Mol. Pharmacol.* **2008**, *1*, 93-105.

111. Mechetner, E. B.; Roninson, I. B., Efficient inhibition of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance with a monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89*, 5824-8.

112. Szakacs, G.; Hall, M. D.; Gottesman, M. M.; Boumendjel, A.; Kachadourian, R.; Day, B. J.; Baubichon-Cortay, H.; Di Pietro, A., Targeting the Achilles heel of multidrug-resistant cancer by exploiting the fitness cost of resistance. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 5753-74.

113. Nakagawa, M.; Schneider, E.; Dixon, K. H.; Horton, J.; Kelley, K.; Morrow, C.; Cowan, K. H., Reduced intracellular drug accumulation in the absence of P-glycoprotein (mdr1) overexpression in mitoxantrone-resistant human MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res.* **1992**, *52*, 6175-81.

114. Chen, Y. N.; Mickley, L. A.; Schwartz, A. M.; Acton, E. M.; Hwang, J. L.; Fojo, A. T., Characterization of adriamycin-resistant human breast cancer cells which display

- overexpression of a novel resistance-related membrane protein. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 10073-80.
115. Bailey-Dell, K. J.; Hassel, B.; Doyle, L. A.; Ross, D. D., Promoter characterization and genomic organization of the human breast cancer resistance protein (ATP-binding cassette transporter G2) gene. *Biochim. Biophys. Acta.* **2001**, *1520*, 234-41.
116. Ni, Z.; Bikadi, Z.; Rosenberg, M. F.; Mao, Q., Structure and function of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Curr. Drug. Metab.* **2010**, *11*, 603-17.
117. Rosenberg, M. F.; Bikadi, Z.; Chan, J.; Liu, X.; Ni, Z.; Cai, X.; Ford, R. C.; Mao, Q., The human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) shows conformational changes with mitoxantrone. *Structure* **2010**, *18*, 482-93.
118. Ozvegy, C.; Litman, T.; Szakacs, G.; Nagy, Z.; Bates, S.; Varadi, A.; Sarkadi, B., Functional characterization of the human multidrug transporter, ABCG2, expressed in insect cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *285*, 111-7.
119. Kage, K.; Tsukahara, S.; Sugiyama, T.; Asada, S.; Ishikawa, E.; Tsuruo, T.; Sugimoto, Y., Dominant-negative inhibition of breast cancer resistance protein as drug efflux pump through the inhibition of S-S dependent homodimerization. *Int. J. Cancer* **2002**, *97*, 626-30.
120. Xu, J.; Liu, Y.; Yang, Y.; Bates, S.; Zhang, J. T., Characterization of oligomeric human half-ABC transporter ATP-binding cassette G2. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 19781-9.
121. McDevitt, C. A.; Collins, R. F.; Conway, M.; Modok, S.; Storm, J.; Kerr, I. D.; Ford, R. C.; Callaghan, R., Purification and 3D structural analysis of oligomeric human multidrug transporter ABCG2. *Structure* **2006**, *14*, 1623-32.
122. Dezi, M.; Fribourg, P. F.; Di Cicco, A.; Arnaud, O.; Marco, S.; Falson, P.; Di Pietro, A.; Levy, D., The multidrug resistance half-transporter ABCG2 is purified as a tetramer upon selective extraction from membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* **2010**, *1798*, 2094-101.
123. Ni, Z.; Mark, M. E.; Cai, X.; Mao, Q., Fluorescence resonance energy transfer (FRET) analysis demonstrates dimer/oligomer formation of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in intact cells. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* **2010**, *1*, 1-11.
124. Henriksen, U.; Fog, J. U.; Litman, T.; Gether, U., Identification of intra- and intermolecular disulfide bridges in the multidrug resistance transporter ABCG2. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 36926-34.
125. Wakabayashi, K.; Nakagawa, H.; Adachi, T.; Kii, I.; Kobatake, E.; Kudo, A.; Ishikawa, T., Identification of cysteine residues critically involved in homodimer formation and protein expression of human ATP-binding cassette transporter ABCG2: a new approach using the flp recombinase system. *J. Exp. Ther. Oncol.* **2006**, *5*, 205-22.
126. Xu, J.; Peng, H.; Chen, Q.; Liu, Y.; Dong, Z.; Zhang, J. T., Oligomerization domain of the multidrug resistance-associated transporter ABCG2 and its dominant inhibitory activity. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 4373-81.
127. Shigeta, J.; Katayama, K.; Mitsuhashi, J.; Noguchi, K.; Sugimoto, Y., BCRP/ABCG2 confers anticancer drug resistance without covalent dimerization. *Cancer Sci.* **2010**, *101*, 1813-21.
128. Polgar, O.; Robey, R. W.; Morisaki, K.; Dean, M.; Michejda, C.; Sauna, Z. E.; Ambudkar, S. V.; Tarasova, N.; Bates, S. E., Mutational analysis of ABCG2: role of the GXXXG motif. *Biochemistry* **2004**, *43*, 9448-56.
129. Gyimesi, G.; Borsodi, D.; Saranko, H.; Tordai, H.; Sarkadi, B.; Hegedus, T., ABCMdb: a database for the comparative analysis of protein mutations in ABC transporters, and a potential framework for a general application. *Hum. Mutat.* **2012**, *33*, 1547-56.
130. Szafraniec, M. J.; Szczygiel, M.; Urbanska, K.; Fiedor, L., Determinants of the activity and substrate recognition of breast cancer resistance protein (ABCG2). *Drug. Metab. Rev.* **2014**, *46*, 459-74.

131. Honjo, Y.; Hrycyna, C. A.; Yan, Q. W.; Medina-Perez, W. Y.; Robey, R. W.; van de Laar, A.; Litman, T.; Dean, M.; Bates, S. E., Acquired mutations in the MXR/BCRP/ABCP gene alter substrate specificity in MXR/BCRP/ABCP-overexpressing cells. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 6635-9.
132. Robey, R. W.; Honjo, Y.; Morisaki, K.; Nadjem, T. A.; Runge, S.; Risbood, M.; Poruchynsky, M. S.; Bates, S. E., Mutations at amino-acid 482 in the ABCG2 gene affect substrate and antagonist specificity. *Br. J. Cancer.* **2003**, *89*, 1971-8.
133. Ni, Z.; Bikadi, Z.; Cai, X.; Rosenberg, M. F.; Mao, Q., Transmembrane helices 1 and 6 of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): identification of polar residues important for drug transport. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **2010**, *299*, C1100-9.
134. Ni, Z.; Bikadi, Z.; Shuster, D. L.; Zhao, C.; Rosenberg, M. F.; Mao, Q., Identification of proline residues in or near the transmembrane helices of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) that are important for transport activity and substrate specificity. *Biochemistry* **2011**, *50*, 8057-66.
135. Miwa, M.; Tsukahara, S.; Ishikawa, E.; Asada, S.; Imai, Y.; Sugimoto, Y., Single amino acid substitutions in the transmembrane domains of breast cancer resistance protein (BCRP) alter cross resistance patterns in transfectants. *Int. J. Cancer.* **2003**, *107*, 757-63.
136. Ozvegy, C.; Varadi, A.; Sarkadi, B., Characterization of drug transport, ATP hydrolysis, and nucleotide trapping by the human ABCG2 multidrug transporter. Modulation of substrate specificity by a point mutation. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 47980-90.
137. Henriksen, U.; Gether, U.; Litman, T., Effect of Walker A mutation (K86M) on oligomerization and surface targeting of the multidrug resistance transporter ABCG2. *J. Cell. Sci.* **2005**, *118*, 1417-26.
138. Hou, Y. X.; Li, C. Z.; Palaniyandi, K.; Magtibay, P. M.; Homolya, L.; Sarkadi, B.; Chang, X. B., Effects of putative catalytic base mutation E211Q on ABCG2-mediated methotrexate transport. *Biochemistry* **2009**, *48*, 9122-31.
139. Imai, Y.; Asada, S.; Tsukahara, S.; Ishikawa, E.; Tsuruo, T.; Sugimoto, Y., Breast cancer resistance protein exports sulfated estrogens but not free estrogens. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *64*, 610-8.
140. Suzuki, M.; Suzuki, H.; Sugimoto, Y.; Sugiyama, Y., ABCG2 transports sulfated conjugates of steroids and xenobiotics. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 22644-9.
141. Chen, Z. S.; Robey, R. W.; Belinsky, M. G.; Shchaveleva, I.; Ren, X. Q.; Sugimoto, Y.; Ross, D. D.; Bates, S. E.; Kruh, G. D., Transport of methotrexate, methotrexate polyglutamates, and 17beta-estradiol 17-(beta-D-glucuronide) by ABCG2: effects of acquired mutations at R482 on methotrexate transport. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 4048-54.
142. van de Wetering, K.; Sapth, S., ABCG2 functions as a general phytoestrogen sulfate transporter in vivo. *FASEB J.* **2012**, *26*, 4014-24.
143. Litman, T.; Brangi, M.; Hudson, E.; Fetsch, P.; Abati, A.; Ross, D. D.; Miyake, K.; Resau, J. H.; Bates, S. E., The multidrug-resistant phenotype associated with overexpression of the new ABC half-transporter, MXR (ABCG2). *J. Cell. Sci.* **2000**, *113* (Pt 11), 2011-21.
144. Nakatomi, K.; Yoshikawa, M.; Oka, M.; Ikegami, Y.; Hayasaka, S.; Sano, K.; Shiozawa, K.; Kawabata, S.; Soda, H.; Ishikawa, T.; Tanabe, S.; Kohno, S., Transport of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) by breast cancer resistance protein ABCG2 in human lung cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *288*, 827-32.
145. Sparreboom, A.; Gelderblom, H.; Marsh, S.; Ahluwalia, R.; Obach, R.; Principe, P.; Twelves, C.; Verweij, J.; McLeod, H. L., Diflomotecan pharmacokinetics in relation to ABCG2 421C>A genotype. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2004**, *76*, 38-44.

146. Sargent, J. M.; Williamson, C. J.; Maliepaard, M.; Elgie, A. W.; Scheper, R. J.; Taylor, C. G., Breast cancer resistance protein expression and resistance to daunorubicin in blast cells from patients with acute myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* **2001**, *115*, 257-62.
147. Allen, J. D.; Brinkhuis, R. F.; Wijnholds, J.; Schinkel, A. H., The mouse Bcrp1/Mxr/Abcp gene: amplification and overexpression in cell lines selected for resistance to topotecan, mitoxantrone, or doxorubicin. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 4237-41.
148. Allen, J. D.; Van Dort, S. C.; Buitelaar, M.; van Tellingen, O.; Schinkel, A. H., Mouse breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) mediates etoposide resistance and transport, but etoposide oral availability is limited primarily by P-glycoprotein. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 1339-44.
149. Robey, R. W.; Medina-Perez, W. Y.; Nishiyama, K.; Lahusen, T.; Miyake, K.; Litman, T.; Senderowicz, A. M.; Ross, D. D.; Bates, S. E., Overexpression of the ATP-binding cassette half-transporter, ABCG2 (Mxr/BCrp/ABCP1), in flavopiridol-resistant human breast cancer cells. *Clin. Cancer Res.* **2001**, *7*, 145-52.
150. Volk, E. L.; Farley, K. M.; Wu, Y.; Li, F.; Robey, R. W.; Schneider, E., Overexpression of wild-type breast cancer resistance protein mediates methotrexate resistance. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 5035-40.
151. Burger, H.; van Tol, H.; Boersma, A. W.; Brok, M.; Wiemer, E. A.; Stoter, G.; Nooter, K., Imatinib mesylate (STI571) is a substrate for the breast cancer resistance protein (BCRP)/ABCG2 drug pump. *Blood* **2004**, *104*, 2940-2.
152. Elkind, N. B.; Szentpetery, Z.; Apati, A.; Ozvegy-Laczka, C.; Varady, G.; Ujhelly, O.; Szabo, K.; Homolya, L.; Varadi, A.; Buday, L.; Keri, G.; Nemet, K.; Sarkadi, B., Multidrug transporter ABCG2 prevents tumor cell death induced by the epidermal growth factor receptor inhibitor Iressa (ZD1839, Gefitinib). *Cancer Res.* **2005**, *65*, 1770-7.
153. Jonker, J. W.; Buitelaar, M.; Wagenaar, E.; Van Der Valk, M. A.; Scheffer, G. L.; Scheper, R. J.; Plosch, T.; Kuipers, F.; Elferink, R. P.; Rosing, H.; Beijnen, J. H.; Schinkel, A. H., The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 15649-54.
154. van Herwaarden, A. E.; Wagenaar, E.; Merino, G.; Jonker, J. W.; Rosing, H.; Beijnen, J. H.; Schinkel, A. H., Multidrug transporter ABCG2/breast cancer resistance protein secretes riboflavin (vitamin B2) into milk. *Mol. Cell. Biol.* **2007**, *27*, 1247-53.
155. Robey, R. W.; Honjo, Y.; van de Laar, A.; Miyake, K.; Regis, J. T.; Litman, T.; Bates, S. E., A functional assay for detection of the mitoxantrone resistance protein, MXR (ABCG2). *Biochim. Biophys. Acta.* **2001**, *1512*, 171-82.
156. Scharenberg, C. W.; Harkey, M. A.; Torok-Storb, B., The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood* **2002**, *99*, 507-12.
157. Mao, Q., BCRP/ABCG2 in the placenta: expression, function and regulation. *Pharm. Res.* **2008**, *25*, 1244-55.
158. Fetsch, P. A.; Abati, A.; Litman, T.; Morisaki, K.; Honjo, Y.; Mittal, K.; Bates, S. E., Localization of the ABCG2 mitoxantrone resistance-associated protein in normal tissues. *Cancer Lett.* **2006**, *235*, 84-92.
159. Maliepaard, M.; Scheffer, G. L.; Faneyte, I. F.; van Gastelen, M. A.; Pijnenborg, A. C.; Schinkel, A. H.; van De Vijver, M. J.; Scheper, R. J.; Schellens, J. H., Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 3458-64.
160. Huls, M.; Brown, C. D.; Windass, A. S.; Sayer, R.; van den Heuvel, J. J.; Heemskerk, S.; Russel, F. G.; Masereeuw, R., The breast cancer resistance protein transporter ABCG2 is

expressed in the human kidney proximal tubule apical membrane. *Kidney Int.* **2008**, *73*, 220-5.

161. Aust, S.; Obrist, P.; Jaeger, W.; Klimpfner, M.; Tucek, G.; Wrba, F.; Penner, E.; Thalhammer, T., Subcellular localization of the ABCG2 transporter in normal and malignant human gallbladder epithelium. *Lab. Invest.* **2004**, *84*, 1024-36.

162. Asashima, T.; Hori, S.; Ohtsuki, S.; Tachikawa, M.; Watanabe, M.; Mukai, C.; Kitagaki, S.; Miyakoshi, N.; Terasaki, T., ATP-binding cassette transporter G2 mediates the efflux of phototoxins on the luminal membrane of retinal capillary endothelial cells. *Pharm. Res.* **2006**, *23*, 1235-42.

163. van Herwaarden, A. E.; Schinkel, A. H., The function of breast cancer resistance protein in epithelial barriers, stem cells and milk secretion of drugs and xenotoxins. *Trends Pharmacol. Sci.* **2006**, *27*, 10-6.

164. Hardwick, L. J.; Velamakanni, S.; van Veen, H. W., The emerging pharmacotherapeutic significance of the breast cancer resistance protein (ABCG2). *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *151*, 163-74.

165. Polgar, O.; Robey, R. W.; Bates, S. E., ABCG2: structure, function and role in drug response. *Expert. Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2008**, *4*, 1-15.

166. Enokizono, J.; Kusuvara, H.; Ose, A.; Schinkel, A. H.; Sugiyama, Y., Quantitative investigation of the role of breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) in limiting brain and testis penetration of xenobiotic compounds. *Drug Metab. Dispos.* **2008**, *36*, 995-1002.

167. Rocchi, E.; Khodjakov, A.; Volk, E. L.; Yang, C. H.; Litman, T.; Bates, S. E.; Schneider, E., The product of the ABC half-transporter gene ABCG2 (BCRP/MXR/ABCP) is expressed in the plasma membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *271*, 42-6.

168. Litman, T.; Jensen, U.; Hansen, A.; Covitz, K. M.; Zhan, Z.; Fetsch, P.; Abati, A.; Hansen, P. R.; Horn, T.; Skovsgaard, T.; Bates, S. E., Use of peptide antibodies to probe for the mitoxantrone resistance-associated protein MXR/BCRP/ABCP/ABCG2. *Biochim. Biophys. Acta.* **2002**, *1565*, 6-16.

169. Scheffer, G. L.; Maliepaard, M.; Pijnenborg, A. C.; van Gastelen, M. A.; de Jong, M. C.; Schroeijers, A. B.; van der Kolk, D. M.; Allen, J. D.; Ross, D. D.; van der Valk, P.; Dalton, W. S.; Schellens, J. H.; Scheper, R. J., Breast cancer resistance protein is localized at the plasma membrane in mitoxantrone- and topotecan-resistant cell lines. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 2589-93.

170. Rajagopal, A.; Simon, S. M., Subcellular localization and activity of multidrug resistance proteins. *Mol. Biol. Cell.* **2003**, *14*, 3389-99.

171. Kobuchi, H.; Moriya, K.; Ogino, T.; Fujita, H.; Inoue, K.; Shuin, T.; Yasuda, T.; Utsumi, K.; Utsumi, T., Mitochondrial localization of ABC transporter ABCG2 and its function in 5-aminolevulinic acid-mediated protoporphyrin IX accumulation. *PloS one* **2012**, *7*, e50082.

172. Sarkadi, B.; Homolya, L.; Szakacs, G.; Varadi, A., Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinnity defense system. *Physiol. Rev.* **2006**, *86*, 1179-236.

173. Vlaming, M. L.; Lagas, J. S.; Schinkel, A. H., Physiological and pharmacological roles of ABCG2 (BCRP): recent findings in Abcg2 knockout mice. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2009**, *61*, 14-25.

174. Jonker, J. W.; Smit, J. W.; Brinkhuis, R. F.; Maliepaard, M.; Beijnen, J. H.; Schellens, J. H.; Schinkel, A. H., Role of breast cancer resistance protein in the bioavailability and fetal penetration of topotecan. *J. Natl. Cancer Inst.* **2000**, *92*, 1651-6.

175. Kruijtz, C. M.; Beijnen, J. H.; Rosing, H.; ten Bokkel Huinink, W. W.; Schot, M.; Jewell, R. C.; Paul, E. M.; Schellens, J. H., Increased oral bioavailability of topotecan in

combination with the breast cancer resistance protein and P-glycoprotein inhibitor GF120918. *J. Clin. Oncol.* **2002**, *20*, 2943-50.

176. van Herwaarden, A. E.; Jonker, J. W.; Wagenaar, E.; Brinkhuis, R. F.; Schellens, J. H.; Beijnen, J. H.; Schinkel, A. H., The breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) restricts exposure to the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Cancer research* **2003**, *63*, 6447-52.

177. van Herwaarden, A. E.; Wagenaar, E.; Karnekamp, B.; Merino, G.; Jonker, J. W.; Schinkel, A. H., Breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) reduces systemic exposure of the dietary carcinogens aflatoxin B1, IQ and Trp-P-1 but also mediates their secretion into breast milk. *Carcinogenesis* **2006**, *27*, 123-30.

178. Kolwankar, D.; Glover, D. D.; Ware, J. A.; Tracy, T. S., Expression and function of ABCB1 and ABCG2 in human placental tissue. *Drug. Metab. Dispos.* **2005**, *33*, 524-9.

179. Schinkel, A. H.; Jonker, J. W., Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2003**, *55*, 3-29.

180. Eisenblatter, T.; Huwel, S.; Galla, H. J., Characterisation of the brain multidrug resistance protein (BMDP/ABCG2/BCRP) expressed at the blood-brain barrier. *Brain Res.* **2003**, *971*, 221-31.

181. Zhang, W.; Mojsilovic-Petrovic, J.; Andrade, M. F.; Zhang, H.; Ball, M.; Stanimirovic, D. B., The expression and functional characterization of ABCG2 in brain endothelial cells and vessels. *FASEB J.* **2003**, *17*, 2085-7.

182. Cooray, H. C.; Blackmore, C. G.; Maskell, L.; Barrand, M. A., Localisation of breast cancer resistance protein in microvessel endothelium of human brain. *Neuroreport* **2002**, *13*, 2059-63.

183. Bakhsheshian, J.; Wei, B. R.; Chang, K. E.; Shukla, S.; Ambudkar, S. V.; Simpson, R. M.; Gottesman, M. M.; Hall, M. D., Bioluminescent imaging of drug efflux at the blood-brain barrier mediated by the transporter ABCG2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 20801-6.

184. Bihorel, S.; Camenisch, G.; Lemaire, M.; Scherrmann, J. M., Influence of breast cancer resistance protein (Abcg2) and p-glycoprotein (Abcb1a) on the transport of imatinib mesylate (Gleevec) across the mouse blood-brain barrier. *J. Neurochem.* **2007**, *102*, 1749-57.

185. Breedveld, P.; Pluim, D.; Cipriani, G.; Wielinga, P.; van Tellingen, O.; Schinkel, A. H.; Schellens, J. H., The effect of Bcrp1 (Abcg2) on the in vivo pharmacokinetics and brain penetration of imatinib mesylate (Gleevec): implications for the use of breast cancer resistance protein and P-glycoprotein inhibitors to enable the brain penetration of imatinib in patients. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 2577-82.

186. Zhou, S.; Schuetz, J. D.; Bunting, K. D.; Colapietro, A. M.; Sampath, J.; Morris, J. J.; Lagutina, I.; Grosveld, G. C.; Osawa, M.; Nakauchi, H.; Sorrentino, B. P., The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat. Med.* **2001**, *7*, 1028-34.

187. Kim, M.; Turnquist, H.; Jackson, J.; Sgagias, M.; Yan, Y.; Gong, M.; Dean, M.; Sharp, J. G.; Cowan, K., The multidrug resistance transporter ABCG2 (breast cancer resistance protein 1) effluxes Hoechst 33342 and is overexpressed in hematopoietic stem cells. *Clin. Cancer Res.* **2002**, *8*, 22-8.

188. Zhou, S.; Morris, J. J.; Barnes, Y.; Lan, L.; Schuetz, J. D.; Sorrentino, B. P., Bcrp1 gene expression is required for normal numbers of side population stem cells in mice, and confers relative protection to mitoxantrone in hematopoietic cells in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 12339-44.

189. Krishnamurthy, P.; Ross, D. D.; Nakanishi, T.; Bailey-Dell, K.; Zhou, S.; Mercer, K. E.; Sarkadi, B.; Sorrentino, B. P.; Schuetz, J. D., The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 24218-25.

190. Jonker, J. W.; Merino, G.; Musters, S.; van Herwaarden, A. E.; Bolscher, E.; Wagenaar, E.; Mesman, E.; Dale, T. C.; Schinkel, A. H., The breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2) concentrates drugs and carcinogenic xenotoxins into milk. *Nat. Med.* **2005**, *11*, 127-9.
191. Merino, G.; Jonker, J. W.; Wagenaar, E.; van Herwaarden, A. E.; Schinkel, A. H., The breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) affects pharmacokinetics, hepatobiliary excretion, and milk secretion of the antibiotic nitrofurantoin. *Mol. Pharmacol.* **2005**, *67*, 1758-64.
192. Merino, G.; Alvarez, A. I.; Pulido, M. M.; Molina, A. J.; Schinkel, A. H.; Prieto, J. G., Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) transports fluoroquinolone antibiotics and affects their oral availability, pharmacokinetics, and milk secretion. *Drug Metab. Dispos.* **2006**, *34*, 690-5.
193. Nakayama, A.; Matsuo, H.; Takada, T.; Ichida, K.; Nakamura, T.; Ikebuchi, Y.; Ito, K.; Hosoya, T.; Kanai, Y.; Suzuki, H.; Shinomiya, N., ABCG2 is a high-capacity urate transporter and its genetic impairment increases serum uric acid levels in humans. *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids* **2011**, *30*, 1091-7.
194. Matsuo, H.; Takada, T.; Ichida, K.; Nakamura, T.; Nakayama, A.; Suzuki, H.; Hosoya, T.; Shinomiya, N., ABCG2/BCRP dysfunction as a major cause of gout. *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids* **2011**, *30*, 1117-28.
195. Woodward, O. M.; Kottgen, A.; Coresh, J.; Boerwinkle, E.; Guggino, W. B.; Kottgen, M., Identification of a urate transporter, ABCG2, with a common functional polymorphism causing gout. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 10338-42.
196. Hosomi, A.; Nakanishi, T.; Fujita, T.; Tamai, I., Extra-renal elimination of uric acid via intestinal efflux transporter BCRP/ABCG2. *PLoS one* **2012**, *7*, e30456.
197. Ichida, K.; Matsuo, H.; Takada, T.; Nakayama, A.; Murakami, K.; Shimizu, T.; Yamanashi, Y.; Kasuga, H.; Nakashima, H.; Nakamura, T.; Takada, Y.; Kawamura, Y.; Inoue, H.; Okada, C.; Utsumi, Y.; Ikebuchi, Y.; Ito, K.; Nakamura, M.; Shinohara, Y.; Hosoyamada, M.; Sakurai, Y.; Shinomiya, N.; Hosoya, T.; Suzuki, H., Decreased extra-renal urate excretion is a common cause of hyperuricemia. *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 764.
198. Deane, R.; Bell, R. D.; Sagare, A.; Zlokovic, B. V., Clearance of amyloid-beta peptide across the blood-brain barrier: implication for therapies in Alzheimer's disease. *CNS Neurol. Disord. Drug. Targets* **2009**, *8*, 16-30.
199. Tai, L. M.; Loughlin, A. J.; Male, D. K.; Romero, I. A., P-glycoprotein and breast cancer resistance protein restrict apical-to-basolateral permeability of human brain endothelium to amyloid-beta. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2009**, *29*, 1079-83.
200. Xiong, H.; Callaghan, D.; Jones, A.; Bai, J.; Rasquinha, I.; Smith, C.; Pei, K.; Walker, D.; Lue, L. F.; Stanimirovic, D.; Zhang, W., ABCG2 is upregulated in Alzheimer's brain with cerebral amyloid angiopathy and may act as a gatekeeper at the blood-brain barrier for Abeta(1-40) peptides. *J. Neurosci.* **2009**, *29*, 5463-75.
201. Do, T. M.; Noel-Hudson, M. S.; Ribes, S.; Besengez, C.; Smirnova, M.; Cisternino, S.; Buyse, M.; Calon, F.; Chimini, G.; Chacun, H.; Scherrmann, J. M.; Farinotti, R.; Bourasset, F., ABCG2- and ABCG4-mediated efflux of amyloid-beta peptide 1-40 at the mouse blood-brain barrier. *J. Alzheimers Dis.* **2012**, *30*, 155-66.
202. Nicolazzo, J. A.; Mehta, D. C., Transport of drugs across the blood-brain barrier in Alzheimer's disease. *Ther. Deliv.* **2010**, *1*, 595-611.
203. Abuznait, A. H.; Cain, C.; Ingram, D.; Burk, D.; Kaddoumi, A., Up-regulation of P-glycoprotein reduces intracellular accumulation of beta amyloid: investigation of P-glycoprotein as a novel therapeutic target for Alzheimer's disease. *J. Pharm. Pharmacol.* **2011**, *63*, 1111-8.

204. Kanzaki, A.; Toi, M.; Nakayama, K.; Bando, H.; Mutoh, M.; Uchida, T.; Fukumoto, M.; Takebayashi, Y., Expression of multidrug resistance-related transporters in human breast carcinoma. *Jpn. J. Cancer Res.* **2001**, *92*, 452-8.
205. Robey, R. W.; Polgar, O.; Deeken, J.; To, K. W.; Bates, S. E., ABCG2: determining its relevance in clinical drug resistance. *Cancer. Metastasis Rev.* **2007**, *26*, 39-57.
206. Diestra, J. E.; Scheffer, G. L.; Catala, I.; Maliepaard, M.; Schellens, J. H.; Scheper, R. J.; Germa-Lluch, J. R.; Izquierdo, M. A., Frequent expression of the multi-drug resistance-associated protein BCRP/MXR/ABCP/ABCG2 in human tumours detected by the BXP-21 monoclonal antibody in paraffin-embedded material. *The Journal of pathology* **2002**, *198*, 213-9.
207. Kawabata, S.; Oka, M.; Soda, H.; Shiozawa, K.; Nakatomi, K.; Tsurutani, J.; Nakamura, Y.; Doi, S.; Kitazaki, T.; Sugahara, K.; Yamada, Y.; Kamihira, S.; Kohno, S., Expression and functional analyses of breast cancer resistance protein in lung cancer. *Clin. Cancer. Res.* **2003**, *9*, 3052-7.
208. Nakanishi, T.; Ross, D. D., Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): its role in multidrug resistance and regulation of its gene expression. *Chin. J. Cancer.* **2012**, *31*, 73-99.
209. Ross, D. D.; Karp, J. E.; Chen, T. T.; Doyle, L. A., Expression of breast cancer resistance protein in blast cells from patients with acute leukemia. *Blood* **2000**, *96*, 365-8.
210. Suvannasankha, A.; Minderman, H.; O'Loughlin, K. L.; Nakanishi, T.; Greco, W. R.; Ross, D. D.; Baer, M. R., Breast cancer resistance protein (BCRP/MXR/ABCG2) in acute myeloid leukemia: discordance between expression and function. *Leukemia* **2004**, *18*, 1252-7.
211. Galimberti, S.; Guerrini, F.; Palumbo, G. A.; Consoli, U.; Fazzi, R.; Morabito, F.; Santini, V.; Petrini, M., Evaluation of BCRP and MDR-1 co-expression by quantitative molecular assessment in AML patients. *Leuk. Res.* **2004**, *28*, 367-72.
212. van der Kolk, D. M.; Vellenga, E.; Scheffer, G. L.; Muller, M.; Bates, S. E.; Scheper, R. J.; de Vries, E. G., Expression and activity of breast cancer resistance protein (BCRP) in de novo and relapsed acute myeloid leukemia. *Blood* **2002**, *99*, 3763-70.
213. Abbott, B. L.; Colapietro, A. M.; Barnes, Y.; Marini, F.; Andreeff, M.; Sorrentino, B. P., Low levels of ABCG2 expression in adult AML blast samples. *Blood* **2002**, *100*, 4594-601.
214. Raaijmakers, M. H.; de Grouw, E. P.; Heuver, L. H.; van der Reijden, B. A.; Jansen, J. H.; Scheper, R. J.; Scheffer, G. L.; de Witte, T. J.; Raymakers, R. A., Breast cancer resistance protein in drug resistance of primitive CD34+38- cells in acute myeloid leukemia. *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 2436-44.
215. Ding, X. W.; Wu, J. H.; Jiang, C. P., ABCG2: a potential marker of stem cells and novel target in stem cell and cancer therapy. *Life Sci.* **2010**, *86*, 631-7.
216. Pick, A.; Muller, H.; Wiese, M., Structure-activity relationships of new inhibitors of breast cancer resistance protein (ABCG2). *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 8224-36.
217. Pawarode, A.; Shukla, S.; Minderman, H.; Fricke, S. M.; Pinder, E. M.; O'Loughlin, K. L.; Ambudkar, S. V.; Baer, M. R., Differential effects of the immunosuppressive agents cyclosporin A, tacrolimus and sirolimus on drug transport by multidrug resistance proteins. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2007**, *60*, 179-88.
218. Rabindran, S. K.; Ross, D. D.; Doyle, L. A.; Yang, W.; Greenberger, L. M., Fumitremorgin C reverses multidrug resistance in cells transfected with the breast cancer resistance protein. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 47-50.
219. Rabindran, S. K.; He, H.; Singh, M.; Brown, E.; Collins, K. I.; Annable, T.; Greenberger, L. M., Reversal of a novel multidrug resistance mechanism in human colon carcinoma cells by fumitremorgin C. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 5850-8.

220. Woehlecke, H.; Osada, H.; Herrmann, A.; Lage, H., Reversal of breast cancer resistance protein-mediated drug resistance by tryprostatin A. *Int. J. Cancer* **2003**, *107*, 721-8.
221. van Loevezijn, A.; Allen, J. D.; Schinkel, A. H.; Koomen, G. J., Inhibition of BCRP-mediated drug efflux by fumitremorgin-type indolyl diketopiperazines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 29-32.
222. Allen, J. D.; van Loevezijn, A.; Lakhai, J. M.; van der Valk, M.; van Tellingen, O.; Reid, G.; Schellens, J. H.; Koomen, G. J.; Schinkel, A. H., Potent and specific inhibition of the breast cancer resistance protein multidrug transporter in vitro and in mouse intestine by a novel analogue of fumitremorgin C. *Mol. Cancer. Ther.* **2002**, *1*, 417-25.
223. Boumendjel, A.; Macalou, S.; Valdameri, G.; Pozza, A.; Gauthier, C.; Arnaud, O.; Nicolle, E.; Magnard, S.; Falson, P.; Terreux, R.; Carrupt, P. A.; Payen, L.; Di Pietro, A., Targeting the multidrug ABCG2 transporter with flavonoidic inhibitors: in vitro optimization and in vivo validation. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 3387-401.
224. Ahmed-Belkacem, A.; Macalou, S.; Borrelli, F.; Capasso, R.; Fattorusso, E.; Taglialatela-Scafati, O.; Di Pietro, A., Nonprenylated rotenoids, a new class of potent breast cancer resistance protein inhibitors. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 1933-8.
225. Lemos, C.; Jansen, G.; Peters, G. J., Drug transporters: recent advances concerning BCRP and tyrosine kinase inhibitors. *Br. J. Cancer.* **2008**, *98*, 857-62.
226. Boumendjel, A.; Nicolle, E.; Moraux, T.; Gerby, B.; Blanc, M.; Ronot, X.; Boutonnat, J., Piperazinobenzopyranones and phenalkylaminobenzopyranones: potent inhibitors of breast cancer resistance protein (ABCG2). *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 7275-81.
227. Valdameri, G.; Pereira Rangel, L.; Spatafora, C.; Guitton, J.; Gauthier, C.; Arnaud, O.; Ferreira-Pereira, A.; Falson, P.; Winnischofer, S. M.; Rocha, M. E.; Tringali, C.; Di Pietro, A., Methoxy stilbenes as potent, specific, untransported, and noncytotoxic inhibitors of breast cancer resistance protein. *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 322-30.
228. Kuhnle, M.; Egger, M.; Muller, C.; Mahringer, A.; Bernhardt, G.; Fricker, G.; Konig, B.; Buschauer, A., Potent and selective inhibitors of breast cancer resistance protein (ABCG2) derived from the p-glycoprotein (ABCB1) modulator tariquidar. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 1190-7.
229. Juvalé, K.; Pape, V. F.; Wiese, M., Investigation of chalcones and benzochalcones as inhibitors of breast cancer resistance protein. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 346-55.
230. Valdameri, G.; Gauthier, C.; Terreux, R.; Kachadourian, R.; Day, B. J.; Winnischofer, S. M.; Rocha, M. E.; Frachet, V.; Ronot, X.; Di Pietro, A.; Boumendjel, A., Investigation of chalcones as selective inhibitors of the breast cancer resistance protein: critical role of methoxylation in both inhibition potency and cytotoxicity. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 3193-200.
231. Jabor Gozzi, G.; Bouaziz, Z.; Winter, E.; Daflon-Yunes, N.; Aichele, D.; Nacereddine, A.; Marminon, C.; Valdameri, G.; Zeinyeh, W.; Bollacke, A.; Guillon, J.; Lacoudre, A.; Pinaud, N.; Cadena, S. M.; Jose, J.; Le Borgne, M.; Di Pietro, A., Converting potent indeno[1,2-b]indole inhibitors of protein kinase CK2 into selective inhibitors of the breast cancer resistance protein ABCG2. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 265-77.
232. Kohler, S. C.; Wiese, M., HM30181 Derivatives as Novel Potent and Selective Inhibitors of the Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2). *J. Med. Chem.* **2015**.
233. Juvalé, K.; Gallus, J.; Wiese, M., Investigation of quinazolines as inhibitors of breast cancer resistance protein (ABCG2). *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 7858-73.
234. Winter, E.; Gozzi, G. J.; Chiaradia-Delatorre, L. D.; Daflon-Yunes, N.; Terreux, R.; Gauthier, C.; Mascarello, A.; Leal, P. C.; Cadena, S. M.; Yunes, R. A.; Nunes, R. J.; Creczynski-Pasa, T. B.; Di Pietro, A., Quinoxaline-substituted chalcones as new inhibitors of breast cancer resistance protein ABCG2: polyspecificity at B-ring position. *Drug Des. Devel. Ther.* **2014**, *8*, 609-19.

235. Winter, E.; Devantier Neuenfeldt, P.; Chiaradia-Delatorre, L. D.; Gauthier, C.; Yunes, R. A.; Nunes, R. J.; Creczynski-Pasa, T. B.; Di Pietro, A., Symmetric bis-chalcones as a new type of breast cancer resistance protein inhibitors with a mechanism different from that of chromones. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 2930-41.
236. Boumendjel, A.; Macalou, S.; Ahmed-Belkacem, A.; Blanc, M.; Di Pietro, A., Acridone derivatives: design, synthesis, and inhibition of breast cancer resistance protein ABCG2. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 2892-7.
237. Arnaud, O.; Boumendjel, A.; Geze, A.; Honorat, M.; Matera, E. L.; Guitton, J.; Stein, W. D.; Bates, S. E.; Falson, P.; Dumontet, C.; Di Pietro, A.; Payen, L., The acridone derivative MBLI-87 sensitizes breast cancer resistance protein-expressing xenografts to irinotecan. *Eur. J. Cancer* **2011**, *47*, 640-8.
238. Valdameri, G.; Genoux-Bastide, E.; Peres, B.; Gauthier, C.; Guitton, J.; Terreux, R.; Winnischofer, S. M.; Rocha, M. E.; Boumendjel, A.; Di Pietro, A., Substituted chromones as highly potent nontoxic inhibitors, specific for the breast cancer resistance protein. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 966-70.
239. Valdameri, G.; Genoux-Bastide, E.; Peres, B.; Gauthier, C.; Guitton, J.; Terreux, R.; Winnischofer, S. M.; Rocha, M. E.; Boumendjel, A.; Di Pietro, A., Substituted chromones as highly potent nontoxic inhibitors, specific for the breast cancer resistance protein. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 966-70.
240. Payen, L.; Honorat, M.; Guitton, J.; Gauthier, C.; Bouard, C.; Lecerf-Schmidt, F.; Peres, B.; Terreux, R.; Gervot, H.; Rioufol, C.; Boumendjel, A.; Puisieux, A.; Di Pietro, A., MBL-II-141, a chromone derivative, enhances irinotecan (CPT-11) anticancer efficiency in ABCG2-positive xenografts. *Oncotarget* **2014**, *5*, 11957-70.
241. Lau, C. K.; Bélanger, P. C.; Dufresne, C.; Scheigetz, J., Novel cyclisation of *S*-(*o*-Acetylarlyl) dimethylthiocarbamates. A new synthesis of 3-hydroxybenzothiophenes and 2-hydroxythiochromones. *J. Org. Chem* **1987**, *52*, 1670-1673.
242. Bantick, J. R.; Cairns, H.; Chambers, A.; Hazard, R.; King, J.; Lee, T. B., Benzodipyran derivatives with antiallergic activity. *J. Med. Chem.* **1976**, *19*, 817-21.
243. Ellis, G. P.; Shaw, D., Benzopyrones. 7. Synthesis and antiallergic activity of some 2-(5-tetrazolyl)chromones. *J. Med. Chem.* **1972**, *15*, 865-7.
244. Lynch, J. K.; Freeman, J. C.; Judd, A. S.; Iyengar, R.; Mulhern, M.; Zhao, G.; Napier, J. J.; Wodka, D.; Brodjian, S.; Dayton, B. D.; Falls, D.; Ogiela, C.; Reilly, R. M.; Campbell, T. J.; Polakowski, J. S.; Hernandez, L.; Marsh, K. C.; Shapiro, R.; Knourek-Segel, V.; Droz, B.; Bush, E.; Brune, M.; Preusser, L. C.; Fryer, R. M.; Reinhart, G. A.; Houseman, K.; Diaz, G.; Mikhail, A.; Limberis, J. T.; Sham, H. L.; Collins, C. A.; Kym, P. R., Optimization of chromone-2-carboxamide melanin concentrating hormone receptor 1 antagonists: assessment of potency, efficacy, and cardiovascular safety. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6569-84.
245. Somei, M.; Yamada, F.; Kurauchi, T.; Nagahama, Y.; Hasegawa, M.; Yamada, K.; Teranishi, S.; Sato, H.; Kaneko, C., The chemistry of indoles. CIII. Simple syntheses of serotonin, N-methylserotonin, bufotenine, 5-methoxy-N-methyltryptamine, bufobutanoic acid, N-(indol-3-yl)methyl-5-methoxy-N-methyltryptamine, and lespedamine based on 1-hydroxyindole chemistry. *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, *49*, 87-96.
246. Mahale, S.; Bharate, S. B.; Manda, S.; Joshi, P.; Bharate, S. S.; Jenkins, P. R.; Vishwakarma, R. A.; Chaudhuri, B., Biphenyl-4-carboxylic acid [2-(1H-indol-3-yl)-ethyl]-methylamide (CA224), a nonplanar analogue of fascaplysin, inhibits Cdk4 and tubulin polymerization: evaluation of in vitro and in vivo anticancer activity. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 9658-72.
247. Song, H.; Yang, J.; Chen, W.; Qin, Y., Synthesis of chiral 3-substituted hexahydropyrroloindoline via intermolecular cyclopropanation. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 6011-4.

248. Perez, E. G.; Cassels, B. K.; Eibl, C.; Gundisch, D., Synthesis and evaluation of N(1)-alkylindole-3-ylalkylammonium compounds as nicotinic acetylcholine receptor ligands. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 3719-27.
249. Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M., Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regiospecific copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-64.
250. Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B., A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*, 2596-9.
251. Böhm, H. J.; Banner, D.; Bendels, S.; Kansy, M.; Kuhn, B.; Müller, K.; Obst-Sander, U.; Stahl, M., Fluorine in medicinal chemistry. *ChemBiochem.* **2004**, *5*, 637-43.
252. Zhou, C. H.; Wang, Y., Recent researches in triazole compounds as medicinal drugs. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 239-80.
253. Liu, B.; Qiu, Q.; Zhao, T.; Jiao, L.; Hou, J.; Li, Y.; Qian, H.; Huang, W., Discovery of novel P-glycoprotein-mediated multidrug resistance inhibitors bearing triazole core via click chemistry. *Chem. Biol. Drug. Des.* **2014**, *84*, 182-91.
254. Winter, E.; Lecerf-Schmidt, F.; Gozzi, G.; Peres, B.; Lightbody, M.; Gauthier, C.; Ozvegy-Laczka, C.; Szakacs, G.; Sarkadi, B.; Creczynski-Pasa, T. B.; Boumendjel, A.; Di Pietro, A., Structure-activity relationships of chromone derivatives toward the mechanism of interaction with and inhibition of breast cancer resistance protein ABCG2. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 9849-60.
255. Winter, E.; Devantier Neuenfeldt, P.; Chiaradia-Delatorre, L. D.; Gauthier, C.; Yunes, R. A.; Nunes, R. J.; Creczynski-Pasa, T. B.; Di Pietro, A., Symmetric bis-chalcones as a new type of breast cancer resistance protein inhibitors with a mechanism different from that of chromones. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 2930-41.
256. Gozzi, G. J.; Bouaziz, Z.; Winter, E.; Daflon-Yunes, N.; Honorat, M.; Guragossian, N.; Marminon, C.; Valdameri, G.; Bollacke, A.; Guillon, J.; Pinaud, N.; Marchivie, M.; Cadena, S. M.; Jose, J.; Le Borgne, M.; Di Pietro, A., Phenolic indeno[1,2-b]indoles as ABCG2-selective potent and non-toxic inhibitors stimulating basal ATPase activity. *Drug. Des. Devel. Ther.* **2015**, *9*, 3481-95.
257. Rangel, L. P.; Winter, E.; Gauthier, C.; Terreux, R.; Chiaradia-Delatorre, L. D.; Mascarello, A.; Nunes, R. J.; Yunes, R. A.; Creczynski-Pasa, T. B.; Macalou, S.; Lorendeau, D.; Baubichon-Cortay, H.; Ferreira-Pereira, A.; Di Pietro, A., New structure-activity relationships of chalcone inhibitors of breast cancer resistance protein: polyspecificity toward inhibition and critical substitutions against cytotoxicity. *Drug. Des. Devel. Ther.* **2013**, *7*, 1043-52.
258. Cruciano, G.; Crivori, P.; Carrupt, P.-A.; Testa, B., Molecular fields in quantitative structure-permeation relationships: the VolSurf approach. *J. Mol. Struct.* **2000**, *503*, 17-30.
259. Crivori, P.; Cruciani, G.; Carrupt, P.-A.; Testa, B., Prediction blood-brain barrier permeation from three-dimensional molecular structure. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2204-2216.
260. Cruciani, G.; Pastor, M.; Guba, W., VolSurf: a new tool for the pharmacokinetic optimization of lead compounds. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2000**, *11 Suppl 2*, S29-39.
261. Baroni, M.; Cruciani, G.; Sciabola, S.; Perruccio, F.; Mason, J. S., A common reference framework for analyzing/comparing proteins and ligands. Fingerprints for Ligands and Proteins (FLAP): theory and application. *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, *47*, 279-94.
262. Cross, S.; Baroni, M.; Goracci, L.; Cruciani, G., GRID-based three-dimensional pharmacophores I: FLAPpharm, a novel approach for pharmacophore elucidation. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52*, 2587-98.

263. Cross, S.; Ortuso, F.; Baroni, M.; Costa, G.; Distinto, S.; Moraca, F.; Alcaro, S.; Cruciani, G., GRID-based three-dimensional pharmacophores II: PharmBench, a benchmark data set for evaluating pharmacophore elucidation methods. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52*, 2599-608.
264. Goodford, P. J., A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 849-57.
265. Goracci, L.; Buratta, S.; Urbanelli, L.; Ferrara, G.; Di Guida, R.; Emiliani, C.; Cross, S., Evaluating the risk of phospholipidosis using a new multidisciplinary pipeline approach. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *92*, 49-63.
266. Sirci, F.; Goracci, L.; Rodriguez, D.; van Muijlwijk-Koezen, J.; Gutierrez-de-Teran, H.; Mannhold, R., Ligand-, structure- and pharmacophore-based molecular fingerprints: a case study on adenosine A(1), A (2A), A (2B), and A (3) receptor antagonists. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2012**, *26*, 1247-66.
267. Milletti, F.; Storchi, L.; Sforza, G.; Cruciani, G., New and original pKa prediction method using grid molecular interaction fields. *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, *47*, 2172-2181.
268. Milletti, F.; Storchi, L.; Sforza, G.; Cross, S.; Cruciani, G., Tautomer enumeration and stability prediction for virtual screening on large chemical databases. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49*, 68-75.
269. Lecerf-Schmidt, F.; Peres, B.; Valdameri, G.; Gauthier, C.; Winter, E.; Payen, L.; Di Pietro, A.; Boumendjel, A., ABCG2: recent discovery of potent and highly selective inhibitors. *Future Med. Chem.* **2013**, *5*, 1037-45.
270. Kast, C.; Gros, P., Topology mapping of the amino-terminal half of multidrug resistance-associated protein by epitope insertion and immunofluorescence. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 26479-87.
271. Bakos, E.; Hegedus, T.; Hollo, Z.; Welker, E.; Tusnady, G. E.; Zaman, G. J.; Flens, M. J.; Varadi, A.; Sarkadi, B., Membrane topology and glycosylation of the human multidrug resistance-associated protein. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 12322-6.
272. Hipfner, D. R.; Almquist, K. C.; Leslie, E. M.; Gerlach, J. H.; Grant, C. E.; Deeley, R. G.; Cole, S. P., Membrane topology of the multidrug resistance protein (MRP). A study of glycosylation-site mutants reveals an extracytosolic NH₂ terminus. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 23623-30.
273. Rosenberg, M. F.; Mao, Q.; Holzenburg, A.; Ford, R. C.; Deeley, R. G.; Cole, S. P., The structure of the multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). crystallization and single-particle analysis. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 16076-82.
274. Hipfner, D. R.; Mao, Q.; Qiu, W.; Leslie, E. M.; Gao, M.; Deeley, R. G.; Cole, S. P., Monoclonal antibodies that inhibit the transport function of the 190-kDa multidrug resistance protein, MRP. Localization of their epitopes to the nucleotide-binding domains of the protein. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 15420-6.
275. Hipfner, D. R.; Gao, M.; Scheffer, G.; Scheper, R. J.; Deeley, R. G.; Cole, S. P., Epitope mapping of monoclonal antibodies specific for the 190-kDa multidrug resistance protein (MRP). *Br. J. Cancer* **1998**, *78*, 1134-40.
276. Koike, K.; Deeley, R. G.; Cole, S. P., Mapping of the MRPm5 epitope to the cytosolic region between transmembrane helices 13 and 14 in the drug and organic anion transporter, MRP1 (ABCC1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *315*, 719-25.
277. Muller, M.; Yong, M.; Peng, X. H.; Petre, B.; Arora, S.; Ambudkar, S. V., Evidence for the role of glycosylation in accessibility of the extracellular domains of human MRP1 (ABCC1). *Biochemistry* **2002**, *41*, 10123-32.
278. Campbell, J. D.; Koike, K.; Moreau, C.; Sansom, M. S.; Deeley, R. G.; Cole, S. P., Molecular modeling correctly predicts the functional importance of Phe594 in transmembrane

- helix 11 of the multidrug resistance protein, MRP1 (ABCC1). *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 463-8.
279. Conseil, G.; Deeley, R. G.; Cole, S. P., Functional importance of three basic residues clustered at the cytosolic interface of transmembrane helix 15 in the multidrug and organic anion transporter MRP1 (ABCC1). *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 43-50.
280. Deeley, R. G.; Cole, S. P., Substrate recognition and transport by multidrug resistance protein 1 (ABCC1). *FEBS Lett.* **2006**, 580, 1103-11.
281. Haimeur, A.; Deeley, R. G.; Cole, S. P., Charged amino acids in the sixth transmembrane helix of multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1) are critical determinants of transport activity. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 41326-33.
282. Zhang, D. W.; Nunoya, K.; Vasa, M.; Gu, H. M.; Theis, A.; Cole, S. P.; Deeley, R. G., Transmembrane helix 11 of multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1): identification of polar amino acids important for substrate specificity and binding of ATP at nucleotide binding domain 1. *Biochemistry* **2004**, 43, 9413-25.
283. Leslie, E. M.; Letourneau, I. J.; Deeley, R. G.; Cole, S. P., Functional and structural consequences of cysteine substitutions in the NH2 proximal region of the human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). *Biochemistry* **2003**, 42, 5214-24.
284. Gao, M.; Yamazaki, M.; Loe, D. W.; Westlake, C. J.; Grant, C. E.; Cole, S. P.; Deeley, R. G., Multidrug resistance protein. Identification of regions required for active transport of leukotriene C4. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 10733-40.
285. Ito, K.; Weigl, K. E.; Deeley, R. G.; Cole, S. P., Mutation of proline residues in the NH(2)-terminal region of the multidrug resistance protein, MRP1 (ABCC1): effects on protein expression, membrane localization, and transport function. *Biochim. Biophys. Acta.* **2003**, 1615, 103-14.
286. Bakos, E.; Evers, R.; Szakacs, G.; Tusnady, G. E.; Welker, E.; Szabo, K.; de Haas, M.; van Deemter, L.; Borst, P.; Varadi, A.; Sarkadi, B., Functional multidrug resistance protein (MRP1) lacking the N-terminal transmembrane domain. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 32167-75.
287. Westlake, C. J.; Qian, Y. M.; Gao, M.; Vasa, M.; Cole, S. P.; Deeley, R. G., Identification of the structural and functional boundaries of the multidrug resistance protein 1 cytoplasmic loop 3. *Biochemistry* **2003**, 42, 14099-113.
288. Westlake, C. J.; Cole, S. P.; Deeley, R. G., Role of the NH2-terminal membrane spanning domain of multidrug resistance protein 1/ABCC1 in protein processing and trafficking. *Mol. Biol. Cell.* **2005**, 16, 2483-92.
289. Chang, X. B., Molecular mechanism of ATP-dependent solute transport by multidrug resistance-associated protein 1. *Methods Mol. Biol.* **2010**, 596, 223-49.
290. Gao, M.; Cui, H. R.; Loe, D. W.; Grant, C. E.; Almquist, K. C.; Cole, S. P.; Deeley, R. G., Comparison of the functional characteristics of the nucleotide binding domains of multidrug resistance protein 1. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 13098-108.
291. Cole, S. P.; Deeley, R. G., Multidrug resistance mediated by the ATP-binding cassette transporter protein MRP. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **1998**, 20, 931-40.
292. Payen, L. F.; Gao, M.; Westlake, C. J.; Cole, S. P.; Deeley, R. G., Role of carboxylate residues adjacent to the conserved core Walker B motifs in the catalytic cycle of multidrug resistance protein 1 (ABCC1). *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 38537-47.
293. Ma, L.; Krishnamachary, N.; Center, M. S., Phosphorylation of the multidrug resistance associated protein gene encoded protein P190. *Biochemistry* **1995**, 34, 3338-43.
294. Yang, Y.; Li, Z.; Mo, W.; Ambadipudi, R.; Arnold, R. J.; Hrnčirova, P.; Novotny, M. V.; Georges, E.; Zhang, J. T., Human ABCC1 interacts and colocalizes with ATP synthase alpha, revealed by interactive proteomics analysis. *J. Proteome. Res.* **2012**, 11, 1364-72.

295. Paumi, C. M.; Chuk, M.; Chevelev, I.; Stagljär, I.; Michaelis, S., Negative regulation of the yeast ABC transporter Ycf1p by phosphorylation within its N-terminal extension. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 27079-88.
296. Paumi, C. M.; Pickin, K. A.; Jarrar, R.; Herren, C. K.; Cowley, S. T., Ycf1p attenuates basal level oxidative stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **2012**, *586*, 847-53.
297. Stolarczyk, E. I.; Reiling, C. J.; Pickin, K. A.; Coppage, R.; Knecht, M. R.; Paumi, C. M., Casein kinase 2alpha regulates multidrug resistance-associated protein 1 function via phosphorylation of Thr249. *Mol. Pharmacol.* **2012**, *82*, 488-99.
298. DeGorter, M. K.; Conseil, G.; Deeley, R. G.; Campbell, R. L.; Cole, S. P., Molecular modeling of the human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *365*, 29-34.
299. Rosenberg, M. F.; Oleschuk, C. J.; Wu, P.; Mao, Q.; Deeley, R. G.; Cole, S. P.; Ford, R. C., Structure of a human multidrug transporter in an inward-facing conformation. *J. Struct. Biol.* **2010**, *170*, 540-7.
300. Ramaen, O.; Leulliot, N.; Sizun, C.; Ulryck, N.; Pamard, O.; Lallemand, J. Y.; Tilbeurgh, H.; Jacquet, E., Structure of the human multidrug resistance protein 1 nucleotide binding domain 1 bound to Mg²⁺/ATP reveals a non-productive catalytic site. *J. Mol. Biol.* **2006**, *359*, 940-9.
301. He, S. M.; Li, R.; Kanwar, J. R.; Zhou, S. F., Structural and functional properties of human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 439-81.
302. Iram, S. H.; Cole, S. P., Expression and function of human MRP1 (ABCC1) is dependent on amino acids in cytoplasmic loop 5 and its interface with nucleotide binding domain 2. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 7202-13.
303. Letourneau, I. J.; Nakajima, A.; Deeley, R. G.; Cole, S. P., Role of proline 1150 in functional interactions between the membrane spanning domains and nucleotide binding domains of the MRP1 (ABCC1) transporter. *Biochem. Pharmacol.* **2008**, *75*, 1659-69.
304. Roelofsen, H.; Muller, M.; Jansen, P. L., Regulation of organic anion transport in the liver. *Yale J. Biol. Med.* **1997**, *70*, 435-45.
305. Hipfner, D. R.; Gauldie, S. D.; Deeley, R. G.; Cole, S. P., Detection of the M(r) 190,000 multidrug resistance protein, MRP, with monoclonal antibodies. *Cancer Res.* **1994**, *54*, 5788-92.
306. Evers, R.; Zaman, G. J.; van Deemter, L.; Jansen, H.; Calafat, J.; Oomen, L. C.; Oude Elferink, R. P.; Borst, P.; Schinkel, A. H., Basolateral localization and export activity of the human multidrug resistance-associated protein in polarized pig kidney cells. *J. Clin. Invest.* **1996**, *97*, 1211-8.
307. Leslie, E. M.; Deeley, R. G.; Cole, S. P., Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2005**, *204*, 216-37.
308. St-Pierre, M. V.; Serrano, M. A.; Macias, R. I.; Dubs, U.; Hoechli, M.; Lauper, U.; Meier, P. J.; Marin, J. J., Expression of members of the multidrug resistance protein family in human term placenta. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2000**, *279*, R1495-503.
309. Zhang, Y.; Schuetz, J. D.; Elmquist, W. F.; Miller, D. W., Plasma membrane localization of multidrug resistance-associated protein homologs in brain capillary endothelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2004**, *311*, 449-55.
310. Bart, J.; Hollema, H.; Groen, H. J.; de Vries, E. G.; Hendrikse, N. H.; Sleijfer, D. T.; Wegman, T. D.; Vaalburg, W.; van der Graaf, W. T., The distribution of drug-efflux pumps, P-gp, BCRP, MRP1 and MRP2, in the normal blood-testis barrier and in primary testicular tumours. *Eur. J. Cancer.* **2004**, *40*, 2064-70.

311. Deeley, R. G.; Westlake, C.; Cole, S. P., Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. *Physiol. Rev.* **2006**, *86*, 849-99.
312. Flens, M. J.; Zaman, G. J.; van der Valk, P.; Izquierdo, M. A.; Schroeijers, A. B.; Scheffer, G. L.; van der Groep, P.; de Haas, M.; Meijer, C. J.; Scheper, R. J., Tissue distribution of the multidrug resistance protein. *Am. J. Pathol.* **1996**, *148*, 1237-47.
313. Dallas, S.; Zhu, X.; Baruchel, S.; Schlichter, L.; Bendayan, R., Functional expression of the multidrug resistance protein 1 in microglia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, *307*, 282-90.
314. Gennuso, F.; Ferneti, C.; Tirolo, C.; Testa, N.; L'Episcopo, F.; Caniglia, S.; Morale, M. C.; Ostrow, J. D.; Pascolo, L.; Tiribelli, C.; Marchetti, B., Bilirubin protects astrocytes from its own toxicity by inducing up-regulation and translocation of multidrug resistance-associated protein 1 (Mrp1). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 2470-5.
315. Sugiyama, D.; Kusuha, H.; Lee, Y. J.; Sugiyama, Y., Involvement of multidrug resistance associated protein 1 (Mrp1) in the efflux transport of 17beta estradiol-D-17beta-glucuronide (E217betaG) across the blood-brain barrier. *Pharm. Res.* **2003**, *20*, 1394-400.
316. Urquhart, B. L.; Kim, R. B., Blood-brain barrier transporters and response to CNS-active drugs. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **2009**, *65*, 1063-70.
317. Leier, I.; Jedlitschky, G.; Buchholz, U.; Cole, S. P.; Deeley, R. G.; Keppler, D., The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C4 and structurally related conjugates. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 27807-10.
318. Loe, D. W.; Almquist, K. C.; Deeley, R. G.; Cole, S. P., Multidrug resistance protein (MRP)-mediated transport of leukotriene C4 and chemotherapeutic agents in membrane vesicles. Demonstration of glutathione-dependent vincristine transport. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 9675-82.
319. Loe, D. W.; Deeley, R. G.; Cole, S. P., Characterization of vincristine transport by the M(r) 190,000 multidrug resistance protein (MRP): evidence for cotransport with reduced glutathione. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 5130-6.
320. Renes, J.; de Vries, E. G.; Nienhuis, E. F.; Jansen, P. L.; Muller, M., ATP- and glutathione-dependent transport of chemotherapeutic drugs by the multidrug resistance protein MRP1. *Br. J. Pharmacol.* **1999**, *126*, 681-8.
321. Hooijberg, J. H.; Broxterman, H. J.; Scheffer, G. L.; Vrasdonk, C.; Heijn, M.; de Jong, M. C.; Scheper, R. J.; Lankelma, J.; Pinedo, H. M., Potent interaction of flavopiridol with MRP1. *Br. J. Cancer* **1999**, *81*, 269-76.
322. Leslie, E. M., Arsenic-glutathione conjugate transport by the human multidrug resistance proteins (MRPs/ABCCs). *J. Inorg. Biochem.* **2012**, *108*, 141-9.
323. Loe, D. W.; Stewart, R. K.; Massey, T. E.; Deeley, R. G.; Cole, S. P., ATP-dependent transport of aflatoxin B1 and its glutathione conjugates by the product of the multidrug resistance protein (MRP) gene. *Mol. Pharmacol.* **1997**, *51*, 1034-41.
324. Paumi, C. M.; Smitherman, P. K.; Townsend, A. J.; Morrow, C. S., Glutathione S-transferases (GSTs) inhibit transcriptional activation by the peroxisomal proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) ligand, 15-deoxy-delta 12,14prostaglandin J2 (15-d-PGJ2). *Biochemistry* **2004**, *43*, 2345-52.
325. Evers, R.; Cnubben, N. H.; Wijnholds, J.; van Deemter, L.; van Bladeren, P. J.; Borst, P., Transport of glutathione prostaglandin A conjugates by the multidrug resistance protein 1. *FEBS Lett.* **1997**, *419*, 112-6.
326. Beedholm-Ebsen, R.; van de Wetering, K.; Hardlei, T.; Nexø, E.; Borst, P.; Moestrup, S. K., Identification of multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1) as a molecular gate for cellular export of cobalamin. *Blood* **2010**, *115*, 1632-9.

327. Hooijberg, J. H.; Jansen, G.; Assaraf, Y. G.; Kathmann, I.; Pieters, R.; Laan, A. C.; Veerman, A. J.; Kaspers, G. J.; Peters, G. J., Folate concentration dependent transport activity of the Multidrug Resistance Protein 1 (ABCC1). *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *67*, 1541-8.
328. Knauer, M. J.; Urquhart, B. L.; Meyer zu Schwabedissen, H. E.; Schwarz, U. I.; Lemke, C. J.; Leake, B. F.; Kim, R. B.; Tirona, R. G., Human skeletal muscle drug transporters determine local exposure and toxicity of statins. *Circ. Res.* **2010**, *106*, 297-306.
329. Krohn, M.; Lange, C.; Hofrichter, J.; Scheffler, K.; Stenzel, J.; Steffen, J.; Schumacher, T.; Bruning, T.; Plath, A. S.; Alfen, F.; Schmidt, A.; Winter, F.; Rateitschak, K.; Wree, A.; Gsponer, J.; Walker, L. C.; Pahnke, J., Cerebral amyloid-beta proteostasis is regulated by the membrane transport protein ABCC1 in mice. *J. Clin. Invest.* **2011**, *121*, 3924-31.
330. Qian, Y. M.; Song, W. C.; Cui, H.; Cole, S. P.; Deeley, R. G., Glutathione stimulates sulfated estrogen transport by multidrug resistance protein 1. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 6404-11.
331. Mao, Q.; Deeley, R. G.; Cole, S. P., Functional reconstitution of substrate transport by purified multidrug resistance protein MRP1 (ABCC1) in phospholipid vesicles. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 34166-72.
332. Cole, S. P.; Deeley, R. G., Transport of glutathione and glutathione conjugates by MRP1. *Trends Pharmacol. Sci.* **2006**, *27*, 438-46.
333. Leslie, E. M.; Deeley, R. G.; Cole, S. P., Bioflavonoid stimulation of glutathione transport by the 190-kDa multidrug resistance protein 1 (MRP1). *Drug. Metab. Dispos.* **2003**, *31*, 11-5.
334. Cole, S. P., Targeting multidrug resistance protein 1 (MRP1, ABCC1): past, present, and future. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2014**, *54*, 95-117.
335. Leier, I.; Jedlitschky, G.; Buchholz, U.; Center, M.; Cole, S. P.; Deeley, R. G.; Keppler, D., ATP-dependent glutathione disulphide transport mediated by the MRP gene-encoded conjugate export pump. *Biochem. J.* **1996**, *314* (Pt 2), 433-7.
336. Li, C.; Ramjeesingh, M.; Wang, W.; Garami, E.; Hewryk, M.; Lee, D.; Rommens, J. M.; Galley, K.; Bear, C. E., ATPase activity of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 28463-8.
337. Ramachandra, M.; Ambudkar, S. V.; Chen, D.; Hrycyna, C. A.; Dey, S.; Gottesman, M. M.; Pastan, I., Human P-glycoprotein exhibits reduced affinity for substrates during a catalytic transition state. *Biochemistry* **1998**, *37*, 5010-9.
338. Mao, Q.; Leslie, E. M.; Deeley, R. G.; Cole, S. P., ATPase activity of purified and reconstituted multidrug resistance protein MRP1 from drug-selected H69AR cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **1999**, *1461*, 69-82.
339. Shapiro, A. B.; Ling, V., ATPase activity of purified and reconstituted P-glycoprotein from Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 3745-54.
340. Manciu, L.; Chang, X. B.; Buyse, F.; Hou, Y. X.; Gustot, A.; Riordan, J. R.; Ruyschaert, J. M., Intermediate structural states involved in MRP1-mediated drug transport. Role of glutathione. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 3347-56.
341. Leslie, E. M.; Mao, Q.; Oleschuk, C. J.; Deeley, R. G.; Cole, S. P., Modulation of multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1) transport and atpase activities by interaction with dietary flavonoids. *Mol. Pharmacol.* **2001**, *59*, 1171-80.
342. Hooijberg, J. H.; Pinedo, H. M.; Vrasdonk, C.; Priebe, W.; Lankelma, J.; Broxterman, H. J., The effect of glutathione on the ATPase activity of MRP1 in its natural membranes. *FEBS Lett.* **2000**, *469*, 47-51.
343. Chang, X. B.; Hou, Y. X.; Riordan, J. R., ATPase activity of purified multidrug resistance-associated protein. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 30962-8.

344. Qin, L.; Zheng, J.; Grant, C. E.; Jia, Z.; Cole, S. P.; Deeley, R. G., Residues responsible for the asymmetric function of the nucleotide binding domains of multidrug resistance protein 1. *Biochemistry* **2008**, *47*, 13952-65.
345. Lewis, R. A.; Austen, K. F., The biologically active leukotrienes. Biosynthesis, metabolism, receptors, functions, and pharmacology. *J. Clin. Invest.* **1984**, *73*, 889-97.
346. Hammarstrom, S., Leukotrienes. *Annu. Rev. Biochem.* **1983**, *52*, 355-77.
347. Feuerstein, G., Leukotrienes and the cardiovascular system. *Prostaglandins* **1984**, *27*, 781-802.
348. Mueller, C. F.; Becher, M. U.; Zimmer, S.; Wassmann, S.; Keuler, B.; Nickenig, G., Angiotensin II triggers release of leukotriene C4 in vascular smooth muscle cells via the multidrug resistance-related protein 1. *Mol. Cell. Biochem.* **2010**, *333*, 261-7.
349. Becher, U. M.; Ghanem, A.; Tiyerili, V.; Furst, D. O.; Nickenig, G.; Mueller, C. F., Inhibition of leukotriene C4 action reduces oxidative stress and apoptosis in cardiomyocytes and impedes remodeling after myocardial injury. *Journal of molecular and cellular cardiology* **2011**, *50*, 570-7.
350. Mueller, C. F.; Wassmann, K.; Widder, J. D.; Wassmann, S.; Chen, C. H.; Keuler, B.; Kudin, A.; Kunz, W. S.; Nickenig, G., Multidrug resistance protein-1 affects oxidative stress, endothelial dysfunction, and atherogenesis via leukotriene C4 export. *Circulation* **2008**, *117*, 2912-8.
351. Mueller, C. F.; Afzal, S.; Becher, U. M.; Wassmann, S.; Nickenig, G.; Wassmann, K., Role of the multidrug resistance protein-1 (MRP1) for endothelial progenitor cell function and survival. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2010**, *49*, 482-9.
352. Lorico, A.; Rappa, G.; Finch, R. A.; Yang, D.; Flavell, R. A.; Sartorelli, A. C., Disruption of the murine MRP (multidrug resistance protein) gene leads to increased sensitivity to etoposide (VP-16) and increased levels of glutathione. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 5238-42.
353. Hirrlinger, J.; Konig, J.; Keppler, D.; Lindenau, J.; Schulz, J. B.; Dringen, R., The multidrug resistance protein MRP1 mediates the release of glutathione disulfide from rat astrocytes during oxidative stress. *J. Neurochem.* **2001**, *76*, 627-36.
354. Renes, J.; de Vries, E. E.; Hooiveld, G. J.; Krikken, I.; Jansen, P. L.; Muller, M., Multidrug resistance protein MRP1 protects against the toxicity of the major lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *Biochem. J.* **2000**, *350 Pt 2*, 555-61.
355. Keppler, D., Multidrug resistance proteins (MRPs, ABCs): importance for pathophysiology and drug therapy. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2011**, 299-323.
356. Zhou, S. F.; Wang, L. L.; Di, Y. M.; Xue, C. C.; Duan, W.; Li, C. G.; Li, Y., Substrates and inhibitors of human multidrug resistance associated proteins and the implications in drug development. *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 1981-2039.
357. Slot, A. J.; Molinski, S. V.; Cole, S. P., Mammalian multidrug-resistance proteins (MRPs). *Essays Biochem.* **2011**, *50*, 179-207.
358. Semsei, A. F.; Erdelyi, D. J.; Ungvari, I.; Csagoly, E.; Hegyi, M. Z.; Kiszal, P. S.; Lautner-Csorba, O.; Szabolcs, J.; Masat, P.; Fekete, G.; Falus, A.; Szalai, C.; Kovacs, G. T., ABCC1 polymorphisms in anthracycline-induced cardiotoxicity in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Cell. Biol. Int.* **2012**, *36*, 79-86.
359. Pajic, M.; Murray, J.; Marshall, G. M.; Cole, S. P.; Norris, M. D.; Haber, M., ABCC1 G2012T single nucleotide polymorphism is associated with patient outcome in primary neuroblastoma and altered stability of the ABCC1 gene transcript. *Pharmacogenet. Genomics.* **2011**, *21*, 270-9.
360. Haber, M.; Smith, J.; Bordow, S. B.; Flemming, C.; Cohn, S. L.; London, W. B.; Marshall, G. M.; Norris, M. D., Association of high-level MRP1 expression with poor clinical

outcome in a large prospective study of primary neuroblastoma. *J. Clin. Oncol.* **2006**, *24*, 1546-53.

361. Narasaki, F.; Oka, M.; Fukuda, M.; Nakano, R.; Ikeda, K.; Takatani, H.; Terashi, K.; Soda, H.; Yano, O.; Nakamura, T.; Doyle, L. A.; Tsuruo, T.; Kohno, S., A novel quinoline derivative, MS-209, overcomes drug resistance of human lung cancer cells expressing the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1997**, *40*, 425-32.

362. Aoki, S.; Chen, Z. S.; Higasiyama, K.; Setiawan, A.; Akiyama, S.; Kobayashi, M., Reversing effect of agosterol A, a spongean sterol acetate, on multidrug resistance in human carcinoma cells. *Jpn. J. Cancer Res.* **2001**, *92*, 886-95.

363. Murakami, N.; Sugimoto, M.; Morita, M.; Akiyama, S.; Kobayashi, M., Synthesis and evaluation of 4-deacetoxyagosterol A as an MDR-modulator. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 2521-4.

364. Loe, D. W.; Oleschuk, C. J.; Deeley, R. G.; Cole, S. P., Structure-activity studies of verapamil analogs that modulate transport of leukotriene C(4) and reduced glutathione by multidrug resistance protein MRP1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *275*, 795-803.

365. Versantvoort, C. H.; Schuurhuis, G. J.; Pinedo, H. M.; Eekman, C. A.; Kuiper, C. M.; Lankelma, J.; Broxterman, H. J., Genistein modulates the decreased drug accumulation in non-P-glycoprotein mediated multidrug resistant tumour cells. *Br. J. Cancer* **1993**, *68*, 939-46.

366. Trompier, D.; Baubichon-Cortay, H.; Chang, X. B.; Maitrejean, M.; Barron, D.; Riordon, J. R.; Di Pietro, A., Multiple flavonoid-binding sites within multidrug resistance protein MRP1. *Cell Mol. Life Sci.* **2003**, *60*, 2164-77.

367. Dantzig, A. H.; Grese, T. A.; Norman, B. H.; Palkowitz, A. D.; Sluka, J. P.; Starling, J. J.; Winter, M. A. Benzothiophene derivatives for treating resistant tumors. EP773217A1, 1997.

368. Gruber, J. M.; Norman, B. H. Preparation of isoxazoloquinolinones as multidrug resistance protein (MRP1) inhibitors. WO9951227A1, 1999.

369. Gollapudi, S.; Kim, C. H.; Tran, B. N.; Sangha, S.; Gupta, S., Probenecid reverses multidrug resistance in multidrug resistance-associated protein-overexpressing HL60/AR and H69/AR cells but not in P-glycoprotein-overexpressing HL60/Tax and P388/ADR cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1997**, *40*, 150-8.

370. Wang, S.; Folkes, A.; Chuckowree, I.; Cockcroft, X.; Sohal, S.; Miller, W.; Milton, J.; Wren, S. P.; Vicker, N.; Depledge, P.; Scott, J.; Smith, L.; Jones, H.; Mistry, P.; Faint, R.; Thompson, D.; Cocks, S., Studies on pyrrolopyrimidines as selective inhibitors of multidrug-resistance-associated protein in multidrug resistance. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1329-38.

371. Wang, S.; Wan, N. C.; Harrison, J.; Miller, W.; Chuckowree, I.; Sohal, S.; Hancox, T. C.; Baker, S.; Folkes, A.; Wilson, F.; Thompson, D.; Cocks, S.; Farmer, H.; Boyce, A.; Freathy, C.; Broadbridge, J.; Scott, J.; Depledge, P.; Faint, R.; Mistry, P.; Charlton, P., Design and synthesis of new templates derived from pyrrolopyrimidine as selective multidrug-resistance-associated protein inhibitors in multidrug resistance. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1339-50.

372. Benyahia, B.; Huguet, S.; Decleves, X.; Mokhtari, K.; Criniere, E.; Bernaudin, J. F.; Scherrmann, J. M.; Delattre, J. Y., Multidrug resistance-associated protein MRP1 expression in human gliomas: chemosensitization to vincristine and etoposide by indomethacin in human glioma cell lines overexpressing MRP1. *J. Neurooncol.* **2004**, *66*, 65-70.

373. Nakano, R.; Oka, M.; Nakamura, T.; Fukuda, M.; Kawabata, S.; Terashi, K.; Tsukamoto, K.; Noguchi, Y.; Soda, H.; Kohno, S., A leukotriene receptor antagonist, ONO-

- 1078, modulates drug sensitivity and leukotriene C4 efflux in lung cancer cells expressing multidrug resistance protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *251*, 307-12.
374. Degenhardt, C. R.; Eickhoff, D. J. Preparation of 2-substituted heterocyclic compounds as regulators of cellular transport proteins. WO2002032868A2, 2002.
375. Boumendjel, A.; Baubichon-Cortay, H.; Trompier, D.; Perrotton, T.; Di Pietro, A., Anticancer multidrug resistance mediated by MRP1: recent advances in the discovery of reversal agents. *Med. Res. Rev.* **2005**, *25*, 453-72.
376. Seprodi, J.; Sarkadi, B.; Hegedus, T.; Keri, G.; Orfi, L.; Idei, M.; Hollosy, F.; Teplan, I.; Okada, Y. Preparation and pharmaceutical compositions of soluble compounds for the inhibition of multidrug resistance. WO2002020527A1, 2002.
377. Norman, B. H.; Gruber, J. M.; Hollinshead, S. P.; Wilson, J. W.; Starling, J. J.; Law, K. L.; Self, T. D.; Tabas, L. B.; Williams, D. C.; Paul, D. C.; Wagner, M. M.; Dantzig, A. H., Tricyclic isoxazoles are novel inhibitors of the multidrug resistance protein (MRP1). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 883-6.
378. Smith, C. D.; Lawrence, D. S. Synthesis of phenoxymethylquinoxalinone and pyrrolo[2,3-b]quinoline derivatives for enhancing chemotherapy. WO2001074790A2, 2001.
379. Degenhardt, C. R.; Eickhoff, D. J. Preparation of 4-[3-heteroaryloxy-2-hydroxypropyl]-1-piperazineacetamides as P-glycoprotein and/or MRP1 inhibitors for treating multidrug resistance. WO2002032874A2, 2002.
380. Flatgaard, J. E.; Bauer, K. E.; Kauvar, L. M., Isozyme specificity of novel glutathione-S-transferase inhibitors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1993**, *33*, 63-70.
381. Burg, D.; Wielinga, P.; Zelcer, N.; Saeki, T.; Mulder, G. J.; Borst, P., Inhibition of the multidrug resistance protein 1 (MRP1) by peptidomimetic glutathione-conjugate analogs. *Mol. Pharmacol.* **2002**, *62*, 1160-6.
382. Ogino, J.; Moore, R. E.; Patterson, G. M.; Smith, C. D., Dendroamides, new cyclic hexapeptides from a blue-green alga. Multidrug-resistance reversing activity of dendroamide A. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 581-6.
383. Xia, Z.; Smith, C. D., Total synthesis of dendroamide A, a novel cyclic peptide that reverses multiple drug resistance. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 3459-66.
384. Pellicani, R. Z.; Stefanachi, A.; Niso, M.; Carotti, A.; Leonetti, F.; Nicolotti, O.; Perrone, R.; Berardi, F.; Cellamare, S.; Colabufo, N. A., Potent galloyl-based selective modulators targeting multidrug resistance associated protein 1 and P-glycoprotein. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 424-36.
385. Hall, M. D.; Handley, M. D.; Gottesman, M. M., Is resistance useless? Multidrug resistance and collateral sensitivity. *Trends Pharmacol. Sci.* **2009**, *30*, 546-56.
386. Pluchino, K. M.; Hall, M. D.; Goldsborough, A. S.; Callaghan, R.; Gottesman, M. M., Collateral sensitivity as a strategy against cancer multidrug resistance. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* **2012**, *15*, 98-105.
387. Bech-Hansen, N. T.; Till, J. E.; Ling, V., Pleiotropic phenotype of colchicine-resistant CHO cells: cross-resistance and collateral sensitivity. *J. Cell. Physiol.* **1976**, *88*, 23-31.
388. Franco, R.; Schoneveld, O. J.; Pappa, A.; Panayiotidis, M. I., The central role of glutathione in the pathophysiology of human diseases. *Arch. Physiol. Biochem.* **2007**, *113*, 234-58.
389. Rudin, C. M.; Yang, Z.; Schumaker, L. M.; VanderWeele, D. J.; Newkirk, K.; Egorin, M. J.; Zuhowski, E. G.; Cullen, K. J., Inhibition of glutathione synthesis reverses Bcl-2-mediated cisplatin resistance. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 312-8.
390. Davison, K.; Cote, S.; Mader, S.; Miller, W. H., Glutathione depletion overcomes resistance to arsenic trioxide in arsenic-resistant cell lines. *Leukemia* **2003**, *17*, 931-40.

391. Trompier, D.; Chang, X. B.; Barattin, R.; du Moulinet D'Hardemare, A.; Di Pietro, A.; Baubichon-Cortay, H., Verapamil and its derivative trigger apoptosis through glutathione extrusion by multidrug resistance protein MRP1. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 4950-6.
392. Benlloch, M.; Ortega, A.; Ferrer, P.; Segarra, R.; Obrador, E.; Asensi, M.; Carretero, J.; Estrela, J. M., Acceleration of glutathione efflux and inhibition of gamma-glutamyltranspeptidase sensitize metastatic B16 melanoma cells to endothelium-induced cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 6950-9.
393. Kachadourian, R.; Day, B. J., Flavonoid-induced glutathione depletion: potential implications for cancer treatment. *Free Radic. Biol. Med.* **2006**, *41*, 65-76.
394. Yusa, K.; Tsuruo, T., Reversal mechanism of multidrug resistance by verapamil: direct binding of verapamil to P-glycoprotein on specific sites and transport of verapamil outward across the plasma membrane of K562/ADM cells. *Cancer. Res.* **1989**, *49*, 5002-6.
395. Twentyman, P. R.; Fox, N. E.; Bleehen, N. M., Drug resistance in human lung cancer cell lines: cross-resistance studies and effects of the calcium transport blocker, verapamil. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1986**, *12*, 1355-8.
396. Cole, S. P.; Sparks, K. E.; Fraser, K.; Loe, D. W.; Grant, C. E.; Wilson, G. M.; Deeley, R. G., Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells. *Cancer Res.* **1994**, *54*, 5902-10.
397. Cullen, K. V.; Davey, R. A.; Davey, M. W., Verapamil-stimulated glutathione transport by the multidrug resistance-associated protein (MRP1) in leukaemia cells. *Biochem. Pharmacol.* **2001**, *62*, 417-24.
398. Loe, D. W.; Deeley, R. G.; Cole, S. P., Verapamil stimulates glutathione transport by the 190-kDa multidrug resistance protein 1 (MRP1). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, *293*, 530-8.
399. Barattin, R.; Perrotton, T.; Trompier, D.; Lorendeau, D.; Di Pietro, A.; d'Hardemare Adu, M.; Baubichon-Cortay, H., Iodination of verapamil for a stronger induction of death, through GSH efflux, of cancer cells overexpressing MRP1. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 6265-74.
400. Perrotton, T.; Trompier, D.; Chang, X. B.; Di Pietro, A.; Baubichon-Cortay, H., (R)- and (S)-verapamil differentially modulate the multidrug-resistant protein MRP1. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 31542-8.
401. Chahar, M. K.; Sharma, N.; Dobhal, M. P.; Joshi, Y. C., Flavonoids: A versatile source of anticancer drugs. *Pharmacogn. Rev.* **2011**, *5*, 1-12.
402. Laberge, R. M.; Karwatsky, J.; Lincoln, M. C.; Leimanis, M. L.; Georges, E., Modulation of GSH levels in ABCC1 expressing tumor cells triggers apoptosis through oxidative stress. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *73*, 1727-37.
403. Lorendeau, D.; Dury, L.; Genoux-Bastide, E.; Lecerf-Schmidt, F.; Simoes-Pires, C.; Carrupt, P. A.; Terreux, R.; Magnard, S.; Di Pietro, A.; Boumendjel, A.; Baubichon-Cortay, H., Collateral sensitivity of resistant MRP1-overexpressing cells to flavonoids and derivatives through GSH efflux. *Biochem. Pharmacol.* **2014**, *90*, 235-45.
404. Genoux-Bastide, E.; Lorendeau, D.; Nicolle, E.; Yahiaoui, S.; Magnard, S.; Di Pietro, A.; Baubichon-Cortay, H.; Boumendjel, A., Identification of xanthenes as selective killers of cancer cells overexpressing the ABC transporter MRP1. *Chem. Med. Chem.* **2011**, *6*, 1478-84.
405. Boumendjel, A.; Di Pietro, A.; Dumontet, C.; Barron, D., Recent advances in the discovery of flavonoids and analogs with high-affinity binding to P-glycoprotein responsible for cancer cell multidrug resistance. *Med. Res. Rev.* **2002**, *22*, 512-29.
406. Pick, A.; Muller, H.; Mayer, R.; Haenisch, B.; Pajeva, I. K.; Weigt, M.; Bonisch, H.; Muller, C. E.; Wiese, M., Structure-activity relationships of flavonoids as inhibitors of breast cancer resistance protein (BCRP). *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 2090-102.

407. Wong, I. L.; Chan, K. F.; Tsang, K. H.; Lam, C. Y.; Zhao, Y.; Chan, T. H.; Chow, L. M., Modulation of multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1)-mediated multidrug resistance by bivalent apigenin homodimers and their derivatives. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5311-22.
408. Anderson, M. E., Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol.* **1985**, *113*, 548-55.
409. Mathai Mammen, S.-K. C., George M. Whitesides, Polyvalent interactions in biological systems, implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed* **1998**, *37*, 2754-2794.
410. Berube, G., Natural and synthetic biologically active dimeric molecules: anticancer agents, anti-HIV agents, steroid derivatives and opioid antagonists. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 131-54.
411. Sauna, Z. E.; Andrus, M. B.; Turner, T. M.; Ambudkar, S. V., Biochemical basis of polyvalency as a strategy for enhancing the efficacy of P-glycoprotein (ABCB1) modulators: stipiamide homodimers separated with defined-length spacers reverse drug efflux with greater efficacy. *Biochemistry* **2004**, *43*, 2262-71.
412. Namanja, H. A.; Emmert, D.; Pires, M. M.; Hrycyna, C. A.; Chmielewski, J., Inhibition of human P-glycoprotein transport and substrate binding using a galantamine dimer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *388*, 672-6.
413. Chan, K. F.; Zhao, Y.; Burkett, B. A.; Wong, I. L.; Chow, L. M.; Chan, T. H., Flavonoid dimers as bivalent modulators for P-glycoprotein-based multidrug resistance: synthetic apigenin homodimers linked with defined-length poly(ethylene glycol) spacers increase drug retention and enhance chemosensitivity in resistant cancer cells. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6742-59.
414. Chan, K. F.; Zhao, Y.; Chow, T. W.; Yan, C. S.; Ma, D. L.; Burkett, B. A.; Wong, I. L.; Chow, L. M.; Chan, T. H., Flavonoid dimers as bivalent modulators for p-glycoprotein-based multidrug resistance: structure-activity relationships. *ChemMedChem* **2009**, *4*, 594-614.
415. Painuly, P.; Tandon, J. S., Two 3-C-methylflavone glycosides from *Eugenia kurzii*. *Phytochemistry* **1983**, *22*, 243-245.
416. Jayashree, B. S.; Alam, A.; Nayak, Y.; Vijay Kumar, D., Synthesis of 3-methylflavones and their antioxidant and antibacterial activities. *Med. Chem. Res.* **2012**, *21*, 1991-1996.
417. Filipe, P.; Silva, A. M.; Seixas, R. S.; Pinto, D. C.; Santos, A.; Patterson, L. K.; Silva, J. N.; Cavaleiro, J. A.; Freitas, J. P.; Maziere, J. C.; Santus, R.; Morliere, P., The alkyl chain length of 3-alkyl-3',4',5,7-tetrahydroxyflavones modulates effective inhibition of oxidative damage in biological systems: illustration with LDL, red blood cells and human skin keratinocytes. *Biochemical pharmacology* **2009**, *77*, 957-64.
418. Chandrasekhar, S.; Seenaiiah, M.; Kumar, A.; Reddy, C. R.; Mamidyala, S. K.; Kumar, C. G.; Balasubramanian, S., Intramolecular copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloaddition of azido-alkynes: synthesis of triazolo-benzoxazepine derivatives and their biological evaluation. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 806-808.
419. Forghieri, M.; Laggner, C.; Paoli, P.; Langer, T.; Manao, G.; Camici, G.; Bondioli, L.; Prati, F.; Costantino, L., Synthesis, activity and molecular modeling of a new series of chromones as low molecular weight protein tyrosine phosphatase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 2658-72.
420. Erickson, R. H.; Natalie, K. J., Jr.; Bock, W.; Lu, Z.; Farzin, F.; Sherrill, R. G.; Meloni, D. J.; Patch, R. J.; Rzesotarski, W. J.; Clifton, J.; et al., (Aminoalkoxy)chromones. Selective sigma receptor ligands. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 1526-35.

421. Kealy, T. J.; Pauson, P. L., A new type of Organo-Iron compound. *Nature* **1951**, *168*, 1039-1040.
422. Wilkinson, G.; Rosenblum, M.; Whiting, M. C.; Woodward, R. B., The structure of iron biscyclopentadienyl. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 2125-6.
423. Yeary, R.A, Chronic toxicity of dicyclopentadienyliron (ferrocene) in dogs. *Toxicol. Appl. Pharm.* **1969**, *15*, 666-676.
424. Kondapi, A. K.; Satyanarayana, N.; Saikrishna, A. D., A study of the topoisomerase II activity in HIV-1 replication using the ferrocene derivatives as probes. *Arch. Biochem. Biophys.* **2006**, *450*, 123-32.
425. Sai Krishna, A. D.; Panda, G.; Kondapi, A. K., Mechanism of action of ferrocene derivatives on the catalytic activity of topoisomerase II α and II β --distinct mode of action of two derivatives. *Arch. Biochem. Biophys.* **2005**, *438*, 206-16.
426. Edwards, E. I.; Epton, R.; Marr, G., A new class of semi-synthetic antibiotics: Ferrocenyl-penicillins and -cephalosporins. *J. Organomet. Chem.* **1976**, *107*, 351-357.
427. Biot, C.; Glorian, G.; Maciejewski, L. A.; Brocard, J. S., Synthesis and antimalarial activity in vitro and in vivo of a new ferrocene-chloroquine analogue. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3715-8.
428. Delhaes, L.; Abessolo, H.; Biot, C.; Berry, L.; Delcourt, P.; Maciejewski, L.; Brocard, J.; Camus, D.; Dive, D., In vitro and in vivo antimalarial activity of ferrochloroquine, a ferrocenyl analogue of chloroquine against chloroquine-resistant malaria parasites. *Parasitol. Res.* **2001**, *87*, 239-44.
429. Itoh, T.; Shirakami, S.; Ishida, N.; Yamashita, Y.; Yoshida, T.; Kim, H. S.; Wataya, Y., Synthesis of novel ferrocenyl sugars and their antimalarial activities. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 1657-9.
430. Chavain, N.; Biot, C., Organometallic complexes: new tools for chemotherapy. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 2729-45.
431. Held, J.; Jeyaraj, S.; Kreidenweiss, A., Antimalarial compounds in Phase II clinical development. *Expert. Opin. Investig. Drugs.* **2015**, *24*, 363-82.
432. Top, S.; Vessieres, A.; Leclercq, G.; Quivy, J.; Tang, J.; Vaissermann, J.; Huche, M.; Jaouen, G., Synthesis, biochemical properties and molecular modelling studies of organometallic specific estrogen receptor modulators (SERMs), the ferrocifens and hydroxyferrocifens: evidence for an antiproliferative effect of hydroxyferrocifens on both hormone-dependent and hormone-independent breast cancer cell lines. *Chemistry* **2003**, *9*, 5223-36.
433. Hillard, E.; Vessieres, A.; Thouin, L.; Jaouen, G.; Amatore, C., Ferrocene-mediated proton-coupled electron transfer in a series of ferrocifen-type breast-cancer drug candidates. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, *45*, 285-90.
434. Fouda, M. F. R.; Abd-Elzaher, M. M.; Abdelsamaia, R. R.; Labib, A. A., On the medicinal chemistry of ferrocene. *App. Org. Chem.* **2007**, *21*, 613-625.
435. Neuse, E. W., Macromolecular Ferrocene Compounds as Cancer Drug Models. *J. Inorg. Organomet. P.* **2005**, *15*, 3-32.
436. Wu, X.; Wilairat, P.; Go, M. L., Antimalarial activity of ferrocenyl chalcones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 2299-302.
437. Wu, X.; Tiekink, E. R.; Kostetski, I.; Kocherginsky, N.; Tan, A. L.; Khoo, S. B.; Wilairat, P.; Go, M. L., Antiplasmodial activity of ferrocenyl chalcones: investigations into the role of ferrocene. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2006**, *27*, 175-87.
438. Monserrat, J. P.; Al-Safi, R. I.; Tiwari, K. N.; Quentin, L.; Chabot, G. G.; Vessieres, A.; Jaouen, G.; Neamati, N.; Hillard, E. A., Ferrocenyl chalcone difluoridoborates inhibit

HIV-1 integrase and display low activity towards cancer and endothelial cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 6195-7.

439. Tiwari, K. N.; Monserrat, J. P.; Hequet, A.; Ganem-Elbaz, C.; Cresteil, T.; Jaouen, G.; Vessieres, A.; Hillard, E. A.; Jolival, C., In vitro inhibitory properties of ferrocene-substituted chalcones and aurones on bacterial and human cell cultures. *Dalton Trans.* **2012**, *41*, 6451-7.

440. Haudecoeur, R.; Ahmed-Belkacem, A.; Yi, W.; Fortune, A.; Brillet, R.; Belle, C.; Nicolle, E.; Pallier, C.; Pawlotsky, J. M.; Boumendjel, A., Discovery of naturally occurring aurones that are potent allosteric inhibitors of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 5395-402.

441. Tiwari, K. N.; Monserrat, J.-P.; De Montigny, F.; Jaouen, G.; Rager, M.-N.; Hillard, E., Synthesis and structural characterization of ferrocenyl-substituted aurones, flavones and flavonols. *Organometallics* **2011**, *30*, 5424-5432.

442. Fitzgerald, D. M.; O'Sullivan, J. F.; Philbin, E. M.; Wheeler, T. S., Ring expansion of 2-benzylidenecoumaran-3-ones, A synthesis of flavones. *J. Chem. Soc.* **1955**, 860-862.

443. Boumendjel, A.; Taiwe, G. S.; Ngo Bum, E.; Chabrol, T.; Beney, C.; Sinniger, V.; Haudecoeur, R.; Marcourt, L.; Challal, S.; Ferreira Queiroz, E.; Souard, F.; Le Borgne, M.; Lomberget, T.; Depaulis, A.; Lavaud, C.; Robins, R.; Wolfender, J. L.; Bonaz, B.; De Waard, M., Occurrence of the synthetic analgesic tramadol in an african medicinal plant. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 11780-11784.

444. Driessen, B.; Reimann, W.; Giertz, H., Effects of the central analgesic tramadol on the uptake and release of noradrenaline and dopamine in vitro. *Br. J. Pharmacol.* **1993**, *108*, 806-11.

445. Raffa, R. B.; Friderichs, E.; Reimann, W.; Shank, R. P.; Codd, E. E.; Vaught, J. L., Opioid and nonopioid components independently contribute to the mechanism of action of tramadol, an 'atypical' opioid analgesic. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1992**, *260*, 275-85.

446. Raffa, R. B.; Friderichs, E.; Reimann, W.; Shank, R. P.; Codd, E. E.; Vaught, J. L.; Jacoby, H. I.; Selve, N., Complementary and synergistic antinociceptive interaction between the enantiomers of tramadol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1993**, *267*, 331-40.

447. Garcia-Quetglas, E.; Azanza, J. R.; Sadaba, B.; Munoz, M. J.; Gil, I.; Campanero, M. A., Pharmacokinetics of tramadol enantiomers and their respective phase I metabolites in relation to CYP2D6 phenotype. *Pharmacol. Res.* **2007**, *55*, 122-30.

448. Lee, C. R.; McTavish, D.; Sorkin, E. M., Tramadol. A preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in acute and chronic pain states. *Drugs* **1993**, *46*, 313-40.

449. Gibson, T. P., Pharmacokinetics, efficacy, and safety of analgesia with a focus on tramadol HCl. *Am. J. Med.* **1996**, *101*, 47S-53S.

450. Dayer, P.; Collart, L.; Desmeules, J., The pharmacology of tramadol. *Drugs* **1994**, *47 Suppl 1*, 3-7.

451. Vazzana, M.; Andreani, T.; Fangueiro, J.; Faggio, C.; Silva, C.; Santini, A.; Garcia, M. L.; Silva, A. M.; Souto, E. B., Tramadol hydrochloride: Pharmacokinetics, pharmacodynamics, adverse side effects, co-administration of drugs and new drug delivery systems. *Biomed. Pharmacother.* **2015**, *70*, 234-238.

452. Hsu, S. K.; Yeh, C. C.; Lin, C. J.; Hsieh, Y. J., An open label trial of the effects and safety profile of extended-release tramadol in the management of chronic pain. *Acta Anaesthesiol. Taiwan* **2012**, *50*, 101-5.

453. Jesse, C. R.; Wilhelm, E. A.; Bortolatto, C. F.; Nogueira, C. W., Evidence for the involvement of the noradrenergic system, dopaminergic and imidazoline receptors in the antidepressant-like effect of tramadol in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2010**, *95*, 344-50.

454. Berrocoso, E.; Mico, J. A.; Ugedo, L., In vivo effect of tramadol on locus coeruleus neurons is mediated by alpha2-adrenoceptors and modulated by serotonin. *Neuropharmacology* **2006**, *51*, 146-53.
455. Salem, E. A.; Wilson, S. K.; Bissada, N. K.; Delk, J. R.; Hellstrom, W. J.; Cleves, M. A., Tramadol HCL has promise in on-demand use to treat premature ejaculation. *J. Sex. Med.* **2008**, *5*, 188-93.
456. Benoit-Vical, F.; Valentin, A.; Cournac, V.; Pelissier, Y.; Mallie, M.; Bastide, J. M., In vitro antiplasmodial activity of stem and root extracts of *Nauclea latifolia* S.M. (Rubiaceae). *J. Ethnopharmacol.* **1998**, *61*, 173-8.
457. Traore, F.; Gasquet, M.; Laget, M.; Guiraud, H.; Di Giorgio, C.; Azas, N.; Doumbo, O.; Timon-David, P., Toxicity and genotoxicity of antimalarial alkaloid rich extracts derived from *Mitragyna inermis* O. Kuntze and *Nauclea latifolia*. *Phytother. Res.* **2000**, *14*, 608-11.
458. Adebajo, A. C.; Odeiran, S. A.; Aliyu, F. A.; Nwafor, P. A.; Nwoko, N. T.; Umana, U. S., In vivo antiplasmodial potentials of the combinations of four nigerian antimalarial plants. *Molecules* **2014**, *19*, 13136-46.
459. Fakae, B. B.; Campbell, A. M.; Barrett, J.; Scott, I. M.; Teesdale-Spittle, P. H.; Liebau, E.; Brophy, P. M., Inhibition of glutathione S-transferases (GSTs) from parasitic nematodes by extracts from traditional Nigerian medicinal plants. *Phytother Res.* **2000**, *14*, 630-4.
460. Onyeyili, P. A.; Nwosu, C. O.; Amin, J. D.; Jibike, J. I., Anthelmintic activity of crude aqueous extract of *Nauclea latifolia* stem bark against ovine nematodes. *Fitoterapia* **2001**, *72*, 12-21.
461. Ademola, I. O.; Fagbemi, B. O.; Idowu, S. O., Anthelmintic efficacy of *Nauclea latifolia* extract against gastrointestinal nematodes of sheep: in vitro and in vivo studies. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* **2006**, *4*, 148-56.
462. Tekwu, E. M.; Pieme, A. C.; Beng, V. P., Investigations of antimicrobial activity of some Cameroonian medicinal plant extracts against bacteria and yeast with gastrointestinal relevance. *J. Ethnopharmacol.* **2012**, *142*, 265-73.
463. Okoli, A. S.; Iroegbu, C. U., Evaluation of extracts of *Anthocleista djalensis*, *Nauclea latifolia* and *Uvaria afzalii* for activity against bacterial isolates from cases of non-gonococcal urethritis. *J. Ethnopharmacol.* **2004**, *92*, 135-44.
464. Gidado, A.; Ameh, D. A.; Atawodi, S. E., Effect of *Nauclea latifolia* leaves aqueous extracts on blood glucose levels of normal and alloxan-induced diabetic rats. *Afr. J. Biotechnol.* **2005**, *4*, 91-93.
465. Gidado, A.; Ameh, D. A.; Atawodi, S. E.; Ibrahim, S., Hypoglycaemic activity of *Nauclea latifolia* Sm. (Rubiaceae) in experimental animals. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* **2008**, *5*, 201-8.
466. Yessoufou, A.; Gbenou, J.; Grissa, O.; Hichami, A.; Simonin, A. M.; Tabka, Z.; Moudachirou, M.; Moutairou, K.; Khan, N. A., Anti-hyperglycemic effects of three medicinal plants in diabetic pregnancy: modulation of T cell proliferation. *BMC Complement Altern. Med.* **2013**, *13*, 77.
467. Ayeleso, A. O.; Oguntibeju, O. O.; Brooks, N. L., In vitro study on the antioxidant potentials of the leaves and fruits of *Nauclea latifolia*. *Scientific World Journal* **2014**, *2014*, 437081.
468. Omale, J.; Ugbede, H. H., Hypocholesterolemic effects of *Nauclea latifolia* (Smith) fruit studied in albino rats. *Am. J. Trop. Med. Pub. Health* **2011**, *1*, 11-21.
469. Amos, S.; Abbah, J.; Chindo, B.; Edmond, I.; Binda, L.; Adzu, B.; Buhari, S.; Odutola, A. A.; Wambebe, C.; Gamaniel, K., Neuropharmacological effects of the aqueous extract of *Nauclea latifolia* root bark in rats and mice. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *97*, 53-7.

470. Ngo Bum, E.; Taiwe, G. S.; Moto, F. C.; Ngoupaye, G. T.; Nkantchoua, G. C.; Pelanken, M. M.; Rakotonirina, S. V.; Rakotonirina, A., Anticonvulsant, anxiolytic, and sedative properties of the roots of *Nauclea latifolia* Smith in mice. *Epilepsy Behav.* **2009**, *15*, 434-40.
471. Taiwe, G. S.; Ngo Bum, E.; Dimo, T.; Talla, E.; Weiss, N.; Dawe, A.; Moto, F. C. O.; Sidiki, N.; Dzeufiet, P. D.; De Waard, M., Antidepressant, myorelaxant and anti-anxiety-like effects of *Nauclea latifolia* Smith (rubiaceae) roots extract in murine models. *Int. J. Pharm.* **2010**, *6*, 364-371.
472. Amouzoun, L. A.-L.; Agbonon, A.; Eklugadegbeku, K.; Aklikokou, K.; Gbéassor, M., Activités antipyrétique et anti-inflammatoire d'extraits hydro-alcooliques des racines et feuilles de *Nauclea latifolia* Smith (Rubiaceae) chez le rat Wistar. *Phytothérapie* **2008**, *6*, 228-231.
473. Taiwe, G. S.; Bum, E. N.; Talla, E.; Dimo, T.; Weiss, N.; Sidiki, N.; Dawe, A.; Moto, F. C.; Dzeufiet, P. D.; De Waard, M., Antipyretic and antinociceptive effects of *Nauclea latifolia* root decoction and possible mechanisms of action. *Pharm. Biol.* **2011**, *49*, 15-25.
474. Abbah, J.; Amos, S.; Chindo, B.; Ngazal, I.; Vongtau, H. O.; Adzu, B.; Farida, T.; Odutola, A. A.; Wambebe, C.; Gamaniel, K. S., Pharmacological evidence favouring the use of *Nauclea latifolia* in malaria ethnopharmacy: effects against nociception, inflammation, and pyrexia in rats and mice. *J. Ethnopharmacol.* **2010**, *127*, 85-90.
475. Taiwe, G. S.; Bum, E. N.; Talla, E.; Dimo, T.; Dawe, A.; Sinniger, V.; Bonaz, B.; Boumendjel, A.; De Waard, M., *Nauclea latifolia* Smith (Rubiaceae) exerts antinociceptive effects in neuropathic pain induced by chronic constriction injury of the sciatic nerve. *J. Ethnopharmacol.* **2014**, *151*, 445-51.
476. Donalisio, M.; Nana, H. M.; Ngane, R. A.; Gatsing, D.; Tchinda, A. T.; Rovito, R.; Cagno, V.; Cagliero, C.; Boyom, F. F.; Rubiolo, P.; Bicchi, C.; Lembo, D., In vitro anti-Herpes simplex virus activity of crude extract of the roots of *Nauclea latifolia* Smith (Rubiaceae). *BMC Complement Altern. Med.* **2013**, *13*, 266.
477. Ukamaka, O.; Paul, N.; Ikechi, E., Antiviral effects of *Nauclea latifolia* on Newcastle Disease Virus (NDV). *Sky J. Microbio. Res.* **2015**, *3*, 001-005.
478. Hotellier, F.; Delaveau, P., Nauclefine et nauclefine deux nouveaux alcaloïdes de type indoloquinolizidine isolés du *Nauclea latifolia*. *Phytochemistry* **1975**, *14*, 1407-1409.
479. Shigemori, H.; Kagata, T.; Ishiyama, H.; Morah, F.; Ohsaki, A.; Kobayashi, J., Naucleamides A-E, new monoterpene indole alkaloids from *Nauclea latifolia*. *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, *51*, 58-61.
480. Ngnokam, D.; Ayafor, J. F.; Connolly, J. D.; Nuzillard, J. M., Nauclefolinine: a new alkaloid from the roots of *Nauclea latifolia*. *Bull. Chem. Soc. Ethiop.* **2003**, *17*, 173-176.
481. Kakuguchi, Y.; Ishiyama, H.; Kubota, T.; Kobayashi, J., Naucleamide F, a new monoterpene indole alkaloid from *Nauclea latifolia*. *Heterocycles* **2009**, *79*, 765-771.
482. Agomuoh, A. A.; Ata, A.; Udenigwe, C. C.; Aluko, R. E.; Irenus, I., Novel indole alkaloids from *Nauclea latifolia* and their renin-inhibitory activities. *Chem. Biodivers.* **2013**, *10*, 401-10.
483. Klotz, U., Occurrence of "natural" benzodiazepines. *Life Sci.* **1991**, *48*, 209-15.
484. Medina, J. H.; Paladini, A. C.; Izquierdo, I., Naturally occurring benzodiazepines and benzodiazepine-like molecules in brain. *Behav. Brain Res.* **1993**, *58*, 1-8.
485. Xu, X. H.; Yao, G. M.; Li, Y. M.; Lu, J. H.; Lin, C. J.; Wang, X.; Kong, C. H., 5-Fluorouracil derivatives from the sponge *Phakellia fusca*. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 285-8.
486. Wright, A. D.; Nielson, J. L.; Tapiolas, D. M.; Liptrot, C. H.; Motti, C. A., A great barrier reef *Sinularia* sp. yields two new cytotoxic diterpenes. *Mar. Drugs.* **2012**, *10*, 1619-30.
487. Vogt, T., Phenylpropanoid biosynthesis. *Mol. Plant.* **2010**, *3*, 2-20.

488. Finefield, J. M.; Sherman, D. H.; Kreitman, M.; Williams, R. M., Enantiomeric natural products: occurrence and biogenesis. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2012**, *51*, 4802-36.
489. Kraus, R.; Spiteller, G., Phenolic compounds from roots of *Urtica dioica*. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 1653-1659.
490. Basile, A.; Senatore, F.; Gargano, R.; Sorbo, S.; Del Pezzo, M.; Lavitola, A.; Ritieni, A.; Bruno, M.; Spatuzzi, D.; Rigano, D.; Vuotto, M. L., Antibacterial and antioxidant activities in *Sideritis italica* (Miller) Greuter et Burdet essential oils. *J. Ethnopharmacol.* **2006**, *107*, 240-8.
491. Curir, P.; Marchesini, A.; Danieli, B.; Mariani, F., 3-Hydroxyacetophenone in carnations is a phytoanticipin active against *Fusarium oxysporum* F. SP. *dianthi*. *Phytochemistry* **1996**, *41*, 447-450.
492. Kesting, J. R.; Tolderlund, I. L.; Pedersen, A. F.; Witt, M.; Jaroszewski, J. W.; Staerk, D., Piperidine and tetrahydropyridine alkaloids from *Lobelia siphilitica* and *Hippobroma longiflora*. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 312-5.
493. Lapadatescu, C.; Ginies, C.; Le Quere, J. L.; Bonnarme, P., Novel scheme for biosynthesis of aryl metabolites from L-phenylalanine in the fungus *Bjerkandera adusta*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 1517-22.
494. Dong, F.; Yang, Z.; Baldermann, S.; Kajitani, Y.; Ota, S.; Kasuga, H.; Imazeki, Y.; Ohnishi, T.; Watanabe, N., Characterization of L-phenylalanine metabolism to acetophenone and 1-phenylethanol in the flowers of *Camellia sinensis* using stable isotope labeling. *J. Plant. Physiol.* **2012**, *169*, 217-25.
495. Negrel, J.; Javelle, F., The biosynthesis of acetovanillone in tobacco cell-suspension cultures. *Phytochemistry* **2010**, *71*, 751-9.
496. Bertin, C.; Weston, L. A.; Huang, T.; Jander, G.; Owens, T.; Meinwald, J.; Schroeder, F. C., Grass roots chemistry: meta-tyrosine, an herbicidal nonprotein amino acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 16964-9.
497. Bringmann, G.; Noll, T. F.; Gulder, T.; Dreyer, M.; Grune, M.; Moskau, D., Polyketide folding in higher plants: biosynthesis of the phenylanthraquinone knipholone. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 3247-52.
498. Romek, K. M.; Nun, P.; Remaud, G. S.; Silvestre, V.; Taiwe, G. S.; Lecerf-Schmidt, F.; Boumendjel, A.; De Waard, M.; Robins, R. J., A retro-biosynthetic approach to the prediction of biosynthetic pathways from position-specific isotope analysis as shown for tramadol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**.
499. Bunsupa, S.; Yamazaki, M.; Saito, K., Quinolizidine alkaloid biosynthesis: recent advances and future prospects. *Frontiers in plant science* **2012**, *3*, 239.
500. Struck, A. W.; Thompson, M. L.; Wong, L. S.; Micklefield, J., S-adenosyl-methionine-dependent methyltransferases: highly versatile enzymes in biocatalysis, biosynthesis and other biotechnological applications. *Chem Bio. Chem.* **2012**, *13*, 2642-55.
501. Golebiewski, W. M.; Spenser, I. D., Biosynthesis of the lupine alkaloids. I. Lupinine. *Can. J. Chem* **1985**, *63*, 2707-2718.
502. Eder, U.; Sauer, G.; Wiechert, R., Total synthesis of optically active steroids. 6. New type of asymmetric cyclization to optically active steroid CD partial structures. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1971**, *10*, 496-7.
503. Kashiwagi, T.; Kotani, S.; Sugiura, M.; Nakajima, M., Synthesis of γ -amino alcohols from aldehydes, enamines, and trichlorosilane using Lewis base catalysts. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 531-539.
504. Guillarme, D.; Nguyen, D. T.; Rudaz, S.; Veuthey, J. L., Method transfer for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis: application to short columns packed with small particle. Part II: gradient experiments. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, *68*, 430-40.

BIBLIOGRAPHIE

505. Lecerf-Schmidt, F.; Haudecoeur, R.; Peres, B.; Ferreira Queiroz, M. M.; Marcourt, L.; Challal, S.; Ferreira Queiroz, E.; Sotoing Taiwe, G.; Lomberger, T.; Le Borgne, M.; Wolfender, J. L.; De Waard, M.; Robins, R. J.; Boumendjel, A., Biomimetic synthesis of Tramadol. *Chem. Commun.* **2015**.

506. Kusari, S.; Tatsimo, S. J.; Zuhlke, S.; Talonsi, F. M.; Kouam, S. F.; Spiteller, M., Tramadol, a true natural product? *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, *53*, 12073-6.

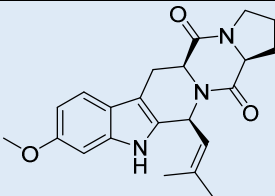
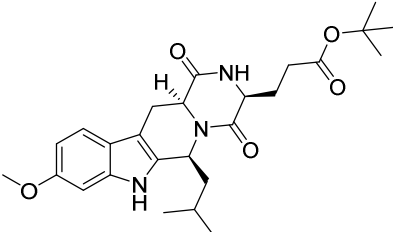
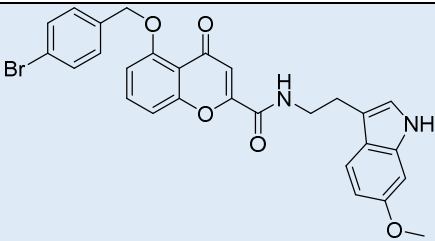
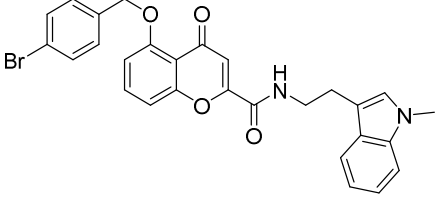
ANNEXES

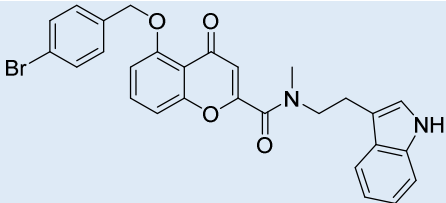
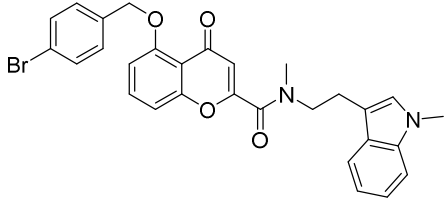
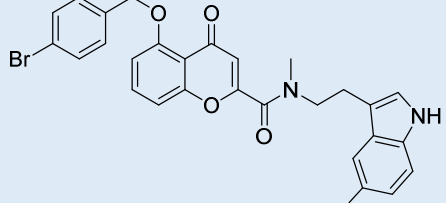
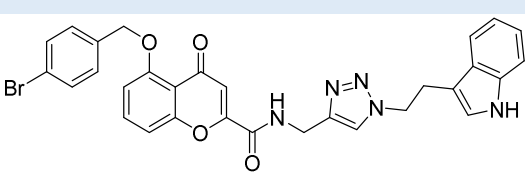
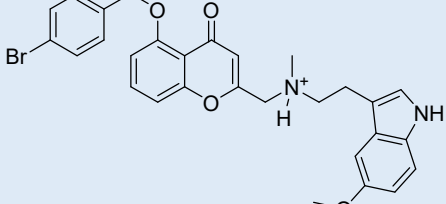
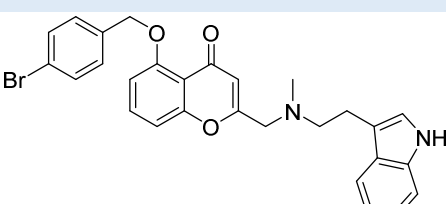
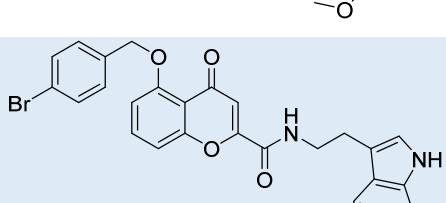
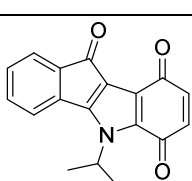
ANNEXE I

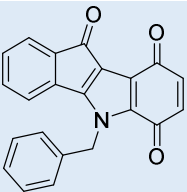
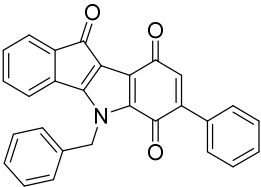
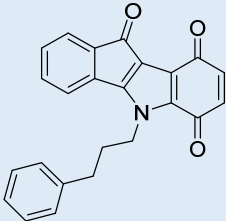
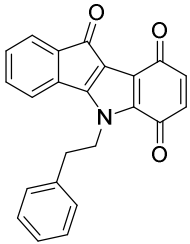
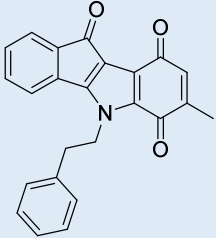
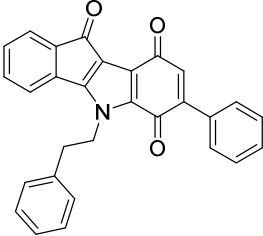
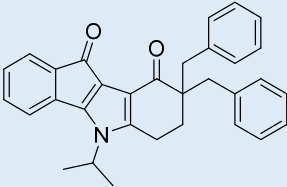
Base de données des molécules inhibitrices de l'activité ATPasique basale (site 4) (A) et des molécules stimulatrices de l'activité ATPasique (site 3) (B)

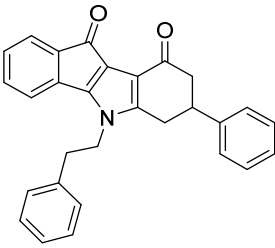
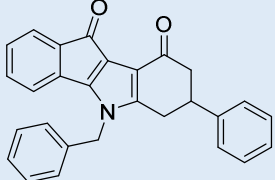
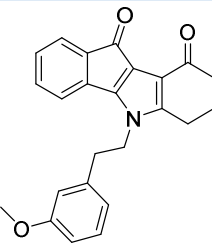
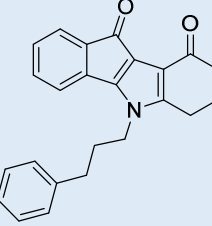
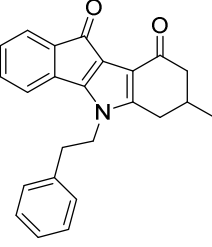
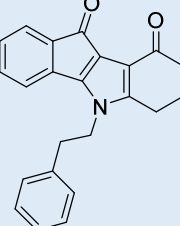
(Pourcentage d'inhibition déterminé par cytométrie de flux. Ces valeurs correspondent à la moyenne \pm la déviation standard issues de trois expériences. Les EC_{50} des composés dont les %inhibition sont inférieurs à 50% n'ont pas été déterminées (ND))

A)

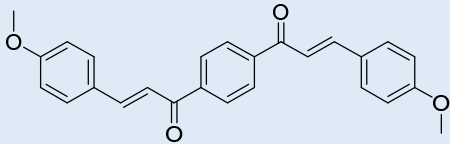
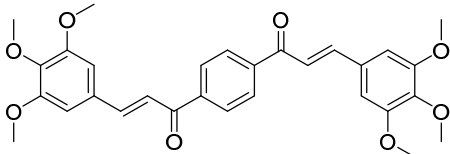
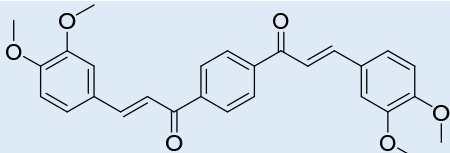
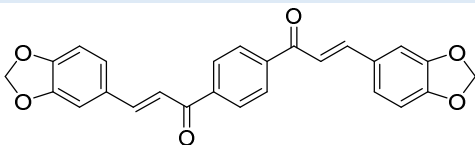
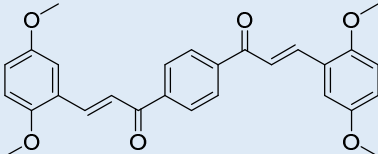
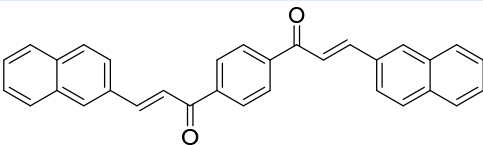
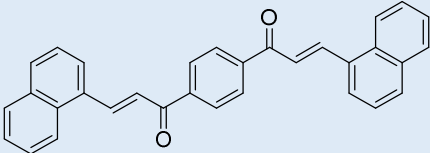
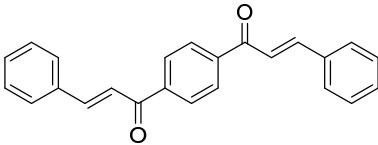
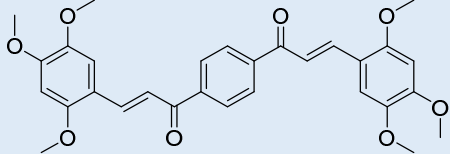
Référence	Structure	% inhibition de l'efflux de la mitoxantrone (à 5 μ M)	EC_{50} (μ M)
Analogues de la FTC			
1i (FTC)		100 \pm 3	2,0 \pm 0,5
2i (Ko143)		106 \pm 1	0,05 \pm 0,02
Dérivés de chromones			
3i		97 \pm 30	0,10 \pm 0,03
4i		85 \pm 5	0,30 \pm 0,01

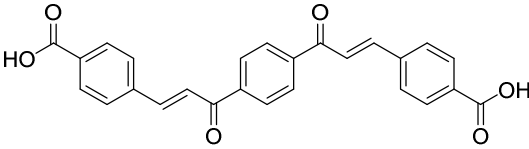
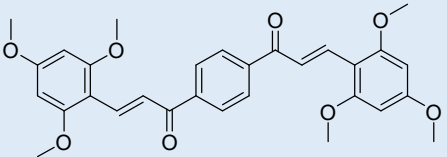
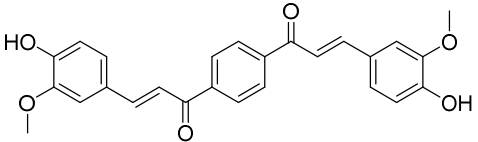
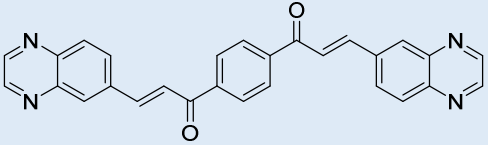
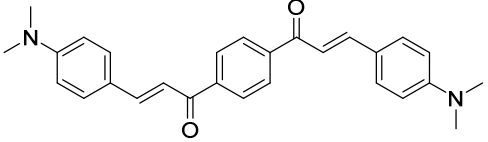
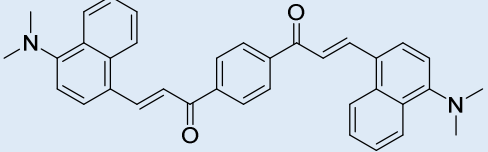
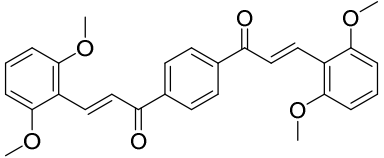
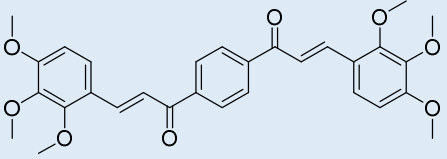
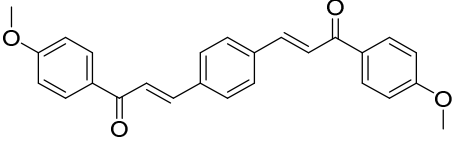
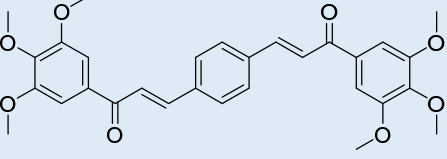
5i		105 ± 29	$1,11 \pm 0,05$
6i		88 ± 11	$1,0 \pm 0,3$
7i		101 ± 20	$0,96 \pm 0,03$
8i		87 ± 17	$0,49 \pm 0,03$
9i		46 ± 10	$1,8 \pm 0,5$
10i		75 ± 8	$1,1 \pm 0,6$
11i (MBL-II-141)		98 ± 7	$0,13 \pm 0,09$
Dérivés benzoquinone			
12i		36	ND

13i		10	ND
14i		41	ND
15i		33	ND
16i		18	ND
17i		99	$0,8 \pm 0,3$
18i		128	$0,43 \pm 0,01$
Dérivés Indeno[1,2-<i>b</i>]indoles			
19i		90 ± 20	$0,6 \pm 0,1$

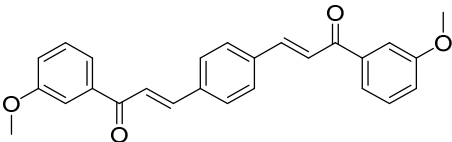
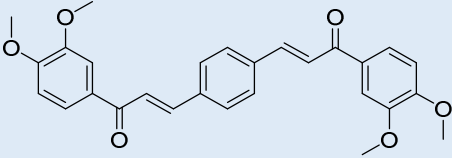
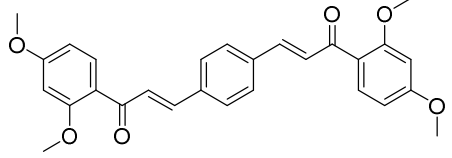
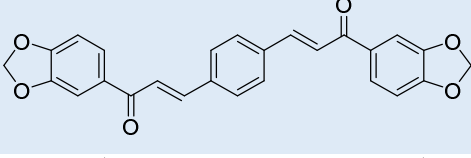
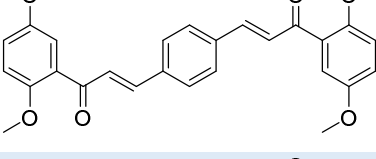
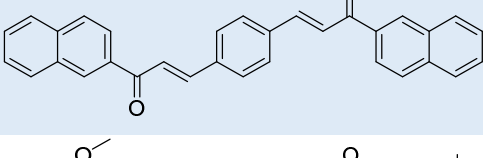
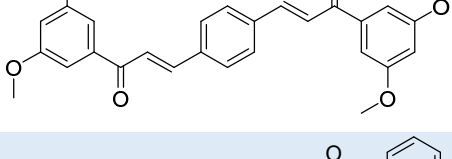
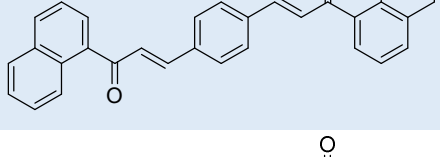
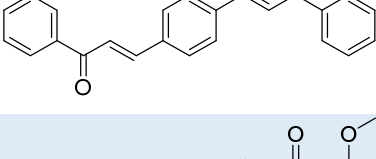
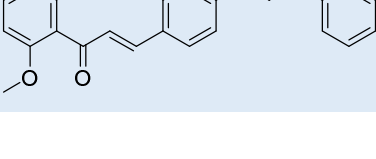
20i		83 ± 13	$0,5 \pm 0,2$
21i		68 ± 10	$0,96 \pm 0,09$
22i		78 ± 14	$0,31 \pm 0,09$
23i		83 ± 25	$0,8 \pm 0,1$
24i		100 ± 21	$0,23 \pm 0,02$
25i		100 14	$0,43 \pm 0,01$

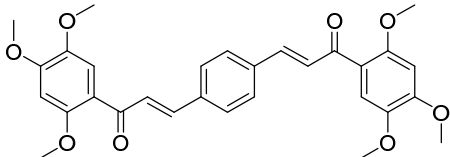
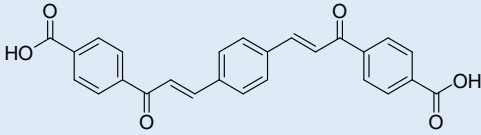
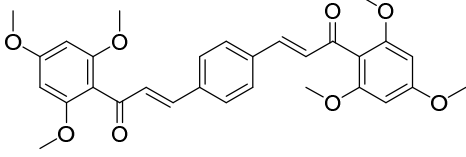
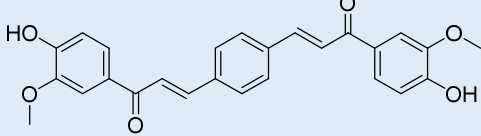
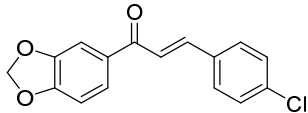
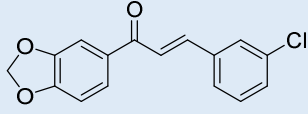
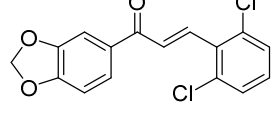
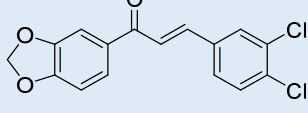
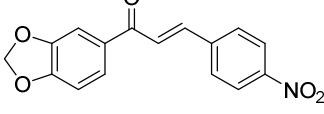
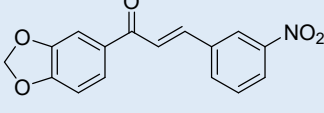
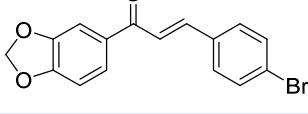
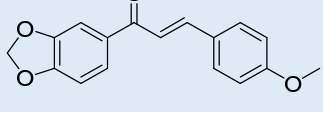
B)

Référence	Structure	% inhibition de l'efflux de la mitoxantrone (à 5 μ M)	EC ₅₀ (μ M)
Dérivés bis-chalcones			
1s BC1		18 \pm 5	ND
2s BC2		43 \pm 17	ND
3s BC4		63 \pm 7	2,1 \pm 0,4
4s BC6		11 \pm 2	ND
5s BC7		96 \pm 7	0,70 \pm 0,02
6s BC8		7 \pm 6	ND
7s BC10		13 \pm 1	ND
8s BC11		13 \pm 1	ND
9s BC13		96 \pm 5	0,30 \pm 0,07

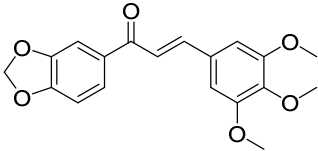
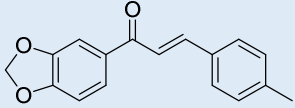
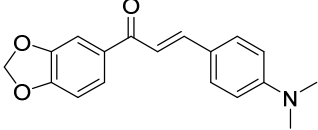
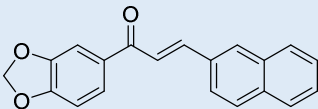
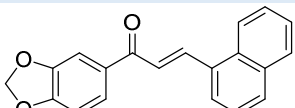
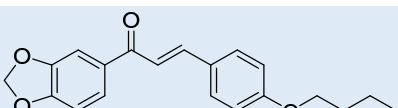
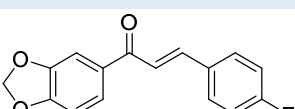
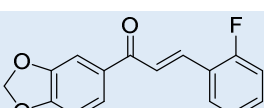
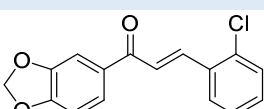
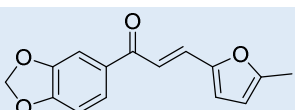
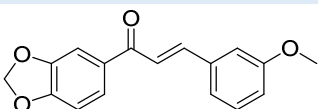
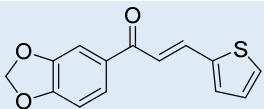
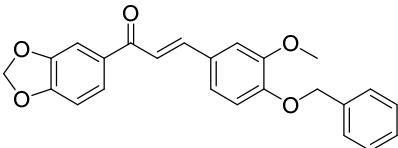
10s BC14		2 ± 2	ND
11s BC15		92 ± 8	$0,40 \pm 0,02$
12s BC16		0 ± 3	ND
13s BC17		18 ± 2	ND
14s BC18		34 ± 1	ND
15s BC19		17 ± 7	ND
16s BC20		108 ± 1	$0,20 \pm 0,04$
17s BC21		86 ± 1	$1,4 \pm 0,6$
18s PM1		27 ± 4	ND
19s PM2		73 ± 15	$1,1 \pm 0,1$

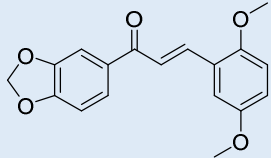
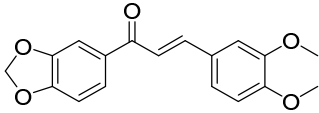
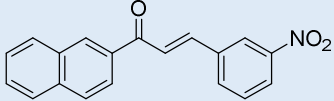
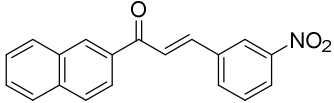
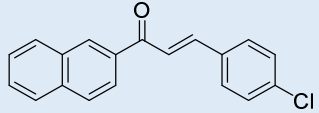
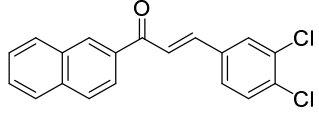
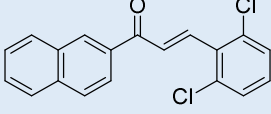
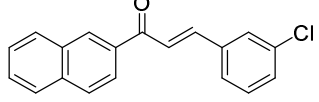
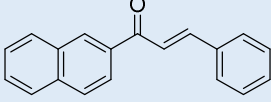
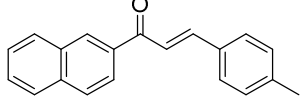
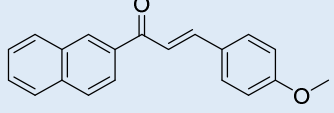
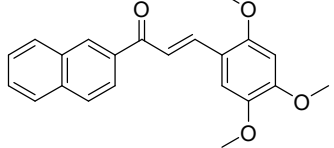
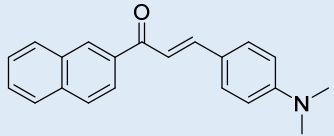
ANNEXES

20s PM3		73 ± 5	$2,3 \pm 0,2$
21s PM4		97 ± 19	$0,8 \pm 0,3$
22s PM5		86 ± 18	$0,9 \pm 0,1$
23s PM6		19 ± 1	ND
24s PM7		74 ± 1	$1,3 \pm 0,2$
25s PM8		45 ± 2	ND
26s PM9		78 ± 4	$0,5 \pm 0,3$
27s PM10		23 ± 3	ND
28s PM11		25 ± 3	ND
29s PM12		95 ± 15	$1,1 \pm 0,1$

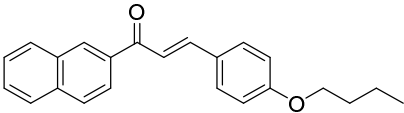
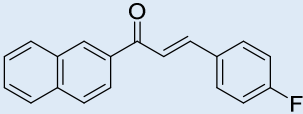
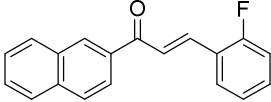
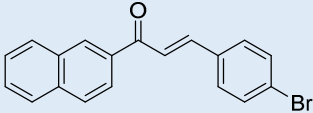
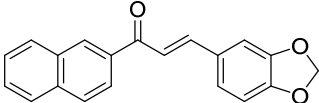
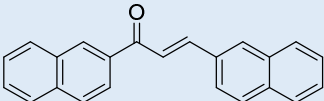
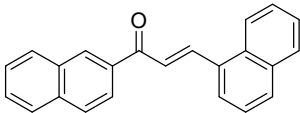
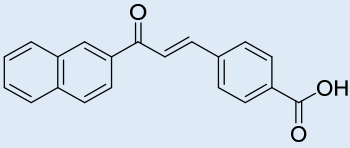
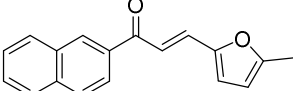
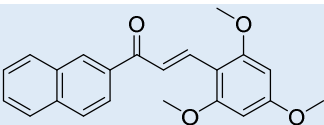
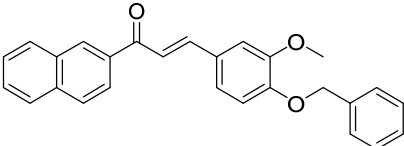
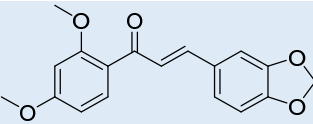
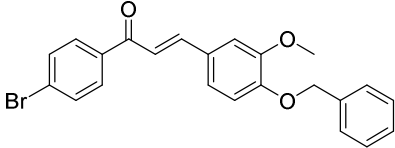
30s PM13		41 ± 5	ND
31s PM14		0 ± 1	ND
32s PM15		66 ± 15	$1,8 \pm 0,4$
33s PM16		28 ± 7	ND
Dérivés chalcones			
34s Chalran1		16 ± 7	ND
35s Chalran2		27 ± 7	ND
36s Chalran3		41 ± 1	ND
37s Chalran 4		13 ± 8	ND
38s Chalran 5		13 ± 5	ND
39s Chalran6		29 ± 11	ND
40s Chalran7		14 ± 8	ND
41s Chalran8		25 ± 4	ND

ANNEXES

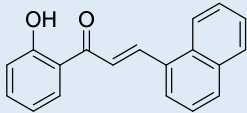
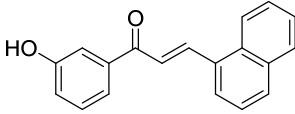
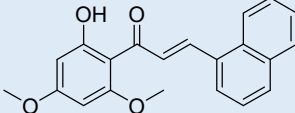
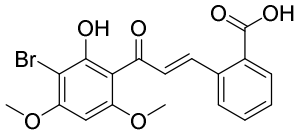
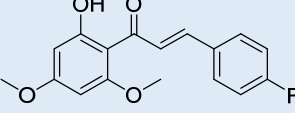
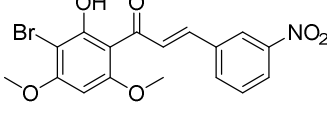
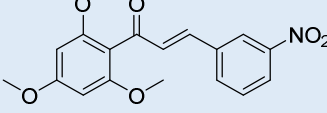
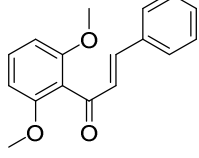
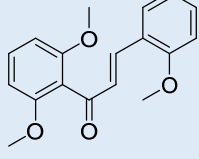
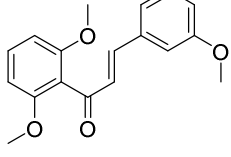
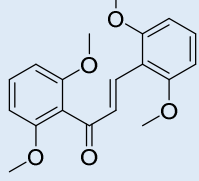
42s Chalran 9		73 ± 10	$0,6 \pm 0,2$
43s Chalran10		15 ± 5	ND
44s Chalran11		32 ± 4	ND
45s Chalran12		8 ± 8	ND
46s Chalran13		57 ± 8	ND
47s Chalran14		33 ± 4	ND
48s Chalran15		19 ± 3	ND
49s Chalran16		25 ± 3	ND
50s Chalran17		59 ± 11	ND
51s Chalran18		30 ± 3	ND
52s Chalran19		30 ± 6	ND
53s Chalran20		18 ± 5	ND
54s Chalran21		86 ± 7	$0,2 \pm 0,1$

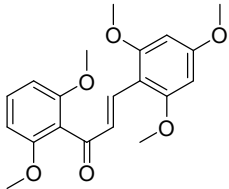
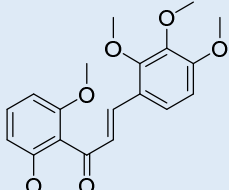
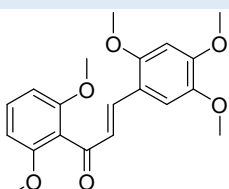
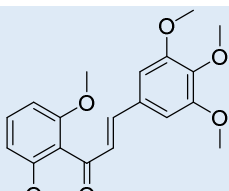
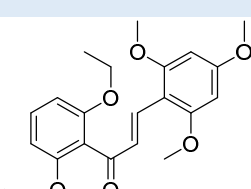
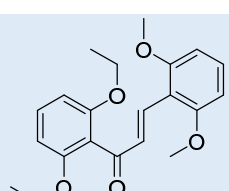
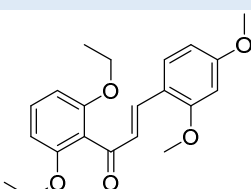
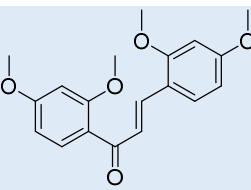
55s Chalran22		80 ± 6	$1,1 \pm 0,2$
56s Chalran23		73 ± 5	$0,54 \pm 0,06$
57s Chalran 24		40 ± 6	ND
58s Chalran25		17 ± 7	ND
59s Chalran26		9 ± 2	ND
60s Chalran27		2 ± 1	ND
61s Chalran28		43 ± 1	ND
62s Chalran29		23 ± 9	ND
63s Chalran30		24 ± 13	ND
64s Chalran31		11 ± 3	ND
65s Chalran32		50 ± 2	ND
66s Chalran33		97 ± 7	$0,23 \pm 0,06$
67s Chalran34		17 ± 8	ND

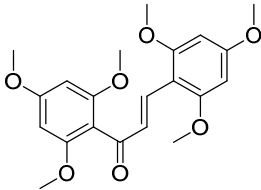
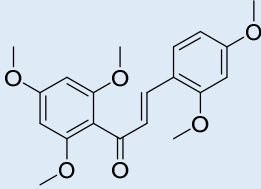
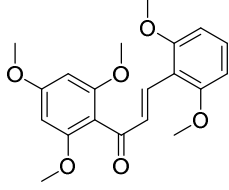
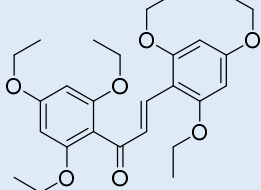
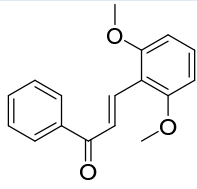
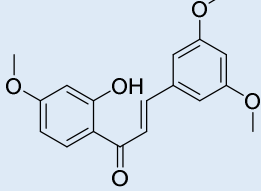
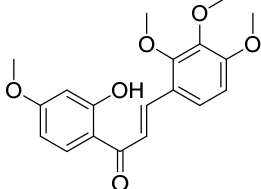
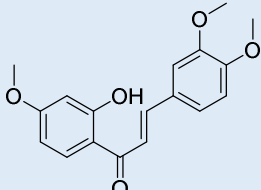
ANNEXES

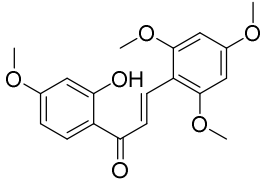
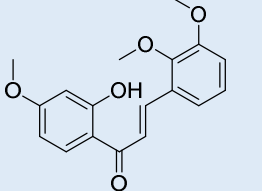
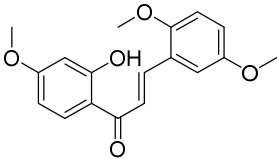
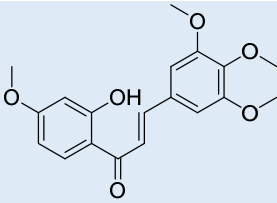
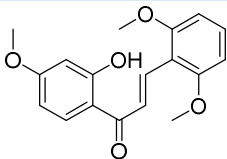
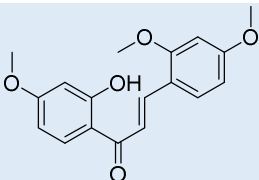
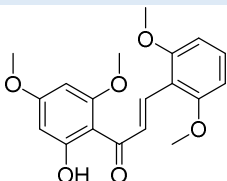
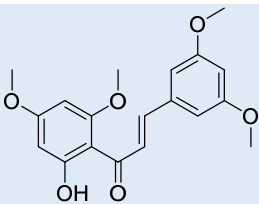
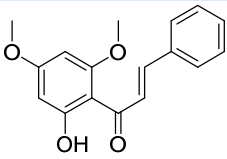
68s Chalran 35		34 ± 9	ND
69s Chalran36		15 ± 7	ND
70s Chalran37		29 ± 11	ND
71s Chalran38		7 ± 1	ND
72s Chalran39		24 ± 7	ND
73s Chalran40		2 ± 2	ND
74s Chalran41		32 ± 5	ND
75s Chalran42		8 ± 2	ND
76s Chalran43		23 ± 8	ND
77s Chalran44		42 ± 9	ND
78s Chalran45		82 ± 4	$0,23 \pm 0,07$
79s Chalran46		88 ± 6	$0,6 \pm 0,1$
80s Chalran47		73 ± 3	$0,29 \pm 0,04$

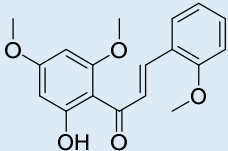
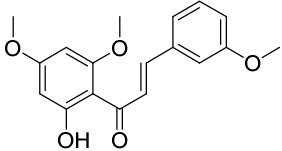
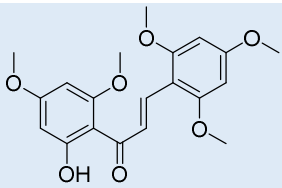
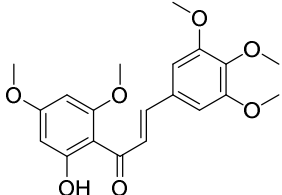
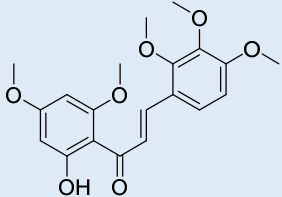
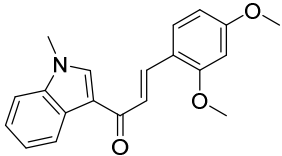
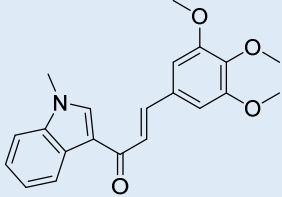
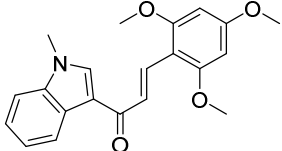
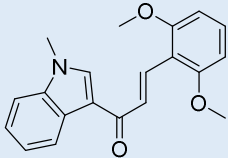
ANNEXES

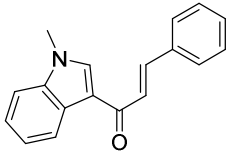
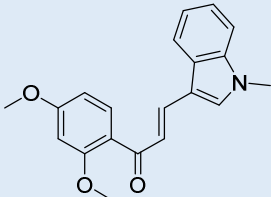
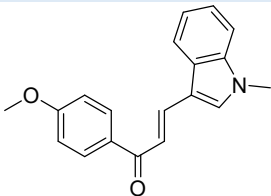
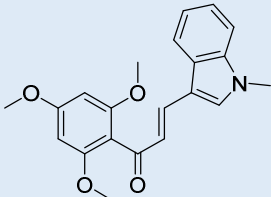
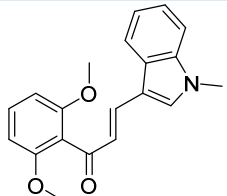
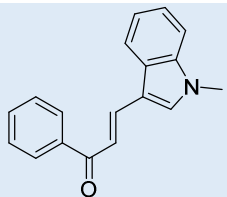
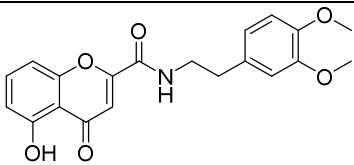
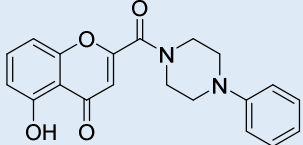
81s Chalran48		49 ± 7	ND
82s Chalran49		57 ± 7	ND
83s Chalran50		82 ± 11	$0,22 \pm 0,07$
84s Chalran51		21 ± 9	ND
85s Chalran52		61 ± 7	ND
86s Chalran53		64 ± 13	ND
87s Chalran54		55 ± 9	ND
88s Chalval1		2 ± 2	ND
89s Chalval2		1 ± 1	ND
90s Chalval3		2 ± 2	ND
91s Chalval4		5 ± 5	ND

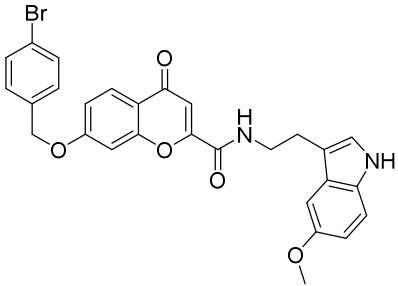
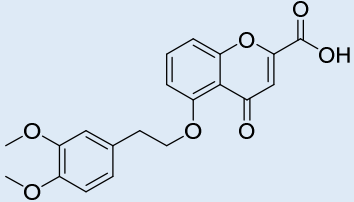
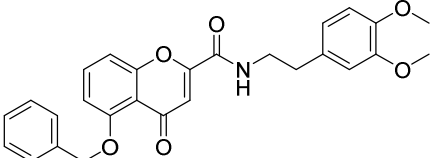
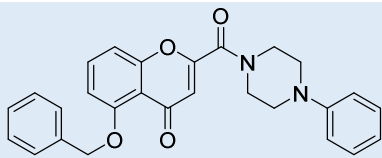
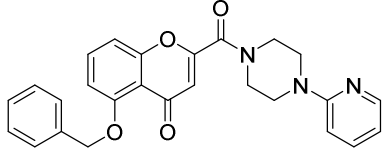
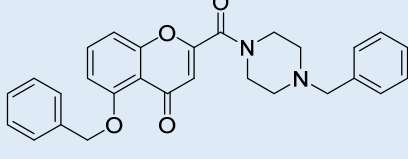
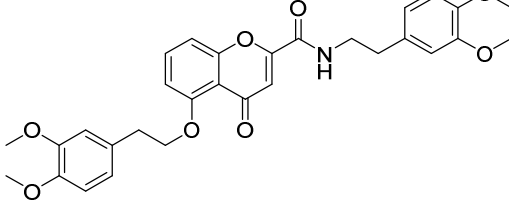
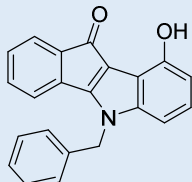
92s Chalval5		15 ± 15	ND
93s Chalval6		8 ± 8	ND
94s Chalval7		15 ± 15	ND
95s Chalval8		30 ± 15	ND
96s Chalval9		40 ± 8	ND
97s Chalval10		15 ± 10	ND
98s Chalval11		40 ± 10	ND
99s Chalval12		50 ± 11	ND

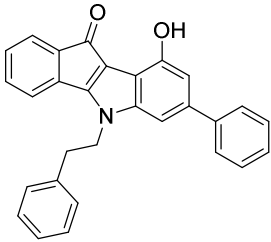
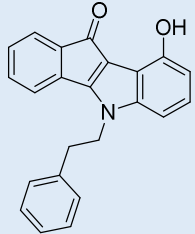
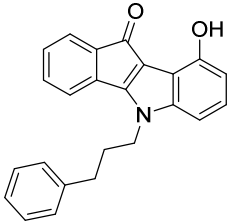
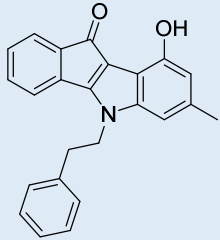
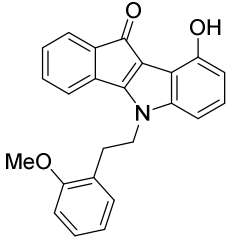
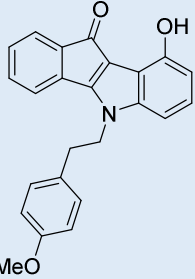
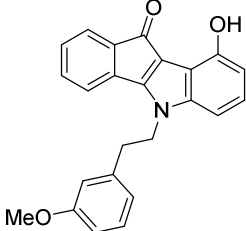
100s Chalval13		60 ± 9	ND
101s Chalval14		50 ± 15	ND
102s Chalval15		14 ± 8	ND
103s Chalval16		50 ± 10	ND
104s Chalval17		20 ± 8	ND
105s Chalval18		60 ± 9	ND
106s Chalval19		55 ± 8	ND
107s Chalval20		75 ± 6	ND

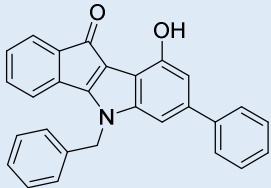
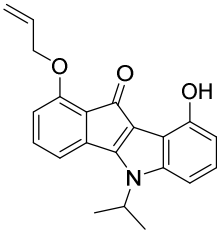
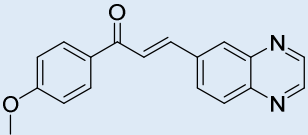
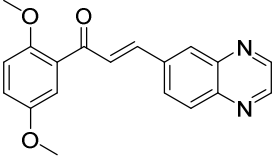
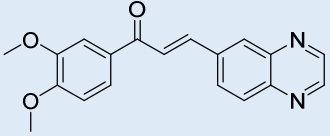
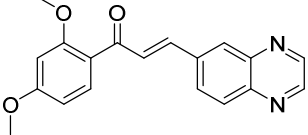
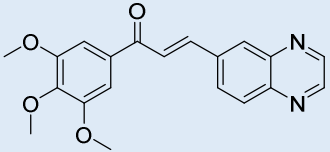
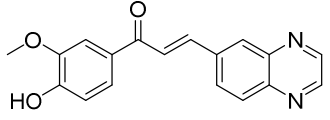
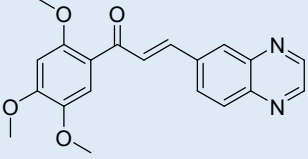
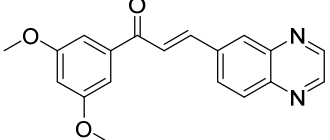
108s Chalval21		65 ± 11	ND
109s Chalval22		45 ± 12	ND
110s Chalval23		42 ± 23	ND
111s Chalval24		90 ± 13	ND
112s Chalval25		75 ± 12	ND
113s Chalval26		57 ± 11	ND
114s Chalval27		100 ± 12	0,4 ± 0,1
115s Chalval28		100 ± 20	0,17 ± 0,07
116s Chalval29		65 ± 10	ND

117s Chalval30		90 ± 9	ND
118s Chalval31		96 ± 3	$0,26 \pm 0,04$
119s Chalval32		87 ± 10	ND
120s Chalval33		81 ± 7	ND
121s Chalval34		90 ± 11	ND
122s Chalval35		100 ± 8	ND
123s Chalval36		65 ± 15	ND
124s Chalval37		100 ± 10	$0,45 \pm 0,09$
125s Chalval38		100 ± 12	$0,27 \pm 0,08$

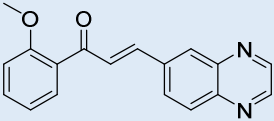
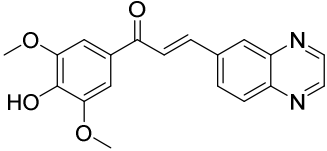
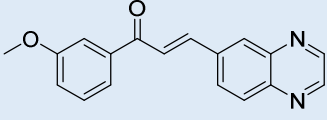
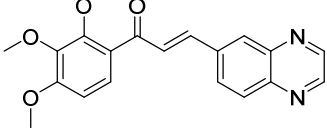
126s Chalval39		100 ± 5	$0,35 \pm 0,09$
127s Chalval40		100 ± 10	ND
128s Chalval41		85 ± 7	ND
129s Chalval42		25 ± 10	ND
130s Chalval43		15 ± 12	ND
131s Chalval44		90 ± 15	ND
Dérivés chromones			
132s Chroval2a		62 ± 2	ND
133s Chroval2b		10 ± 2	ND

134s Chroval4i		80 ± 5	$1,3 \pm 0,6$
135s Chroval5a		27 ± 5	ND
136s Chroval6a		100 ± 5	0,17
137s Chroval6b		66 ± 12	ND
138s Chroval6c		46 ± 3	ND
139s Chroval6d		48 ± 3	ND
140s Chroval6e		100 ± 5	0,47
Dérivés hydroxyindénindoles			
141s 5c-oh-indenoindole		68	ND

142s BZA20		111 ± 2	$0,51 \pm 0,09$
143s BZA27		81 ± 5	$0,16 \pm 0,02$
144s SaA4		98 ± 25	$0,6 \pm 0,2$
145s SiA4		92 ± 22	$0,16 \pm 0,01$
146s MQ4		85 ± 11	$0,15 \pm 0,01$
147s MQ8		111 ± 14	$0,20 \pm 0,01$
148s BZA37		100 ± 10	$0,37 \pm 0,09$

149s BZA32		56	$4,8 \pm 0,9$
150s THN29		75	$0,9 \pm 0,3$
Dérivés chalcones substituées avec des groupements quinoxalines			
151s QX1		61 ± 8	$2,8 \pm 0,5$
152s QX2		78 ± 5	$1,7 \pm 0,2$
153s QX3		73 ± 11	$1,9 \pm 0,7$
154s QX4		86 ± 13	1 ± 1
155s QX5		63 ± 12	2 ± 2
156s QX6		44 ± 10	16 ± 2
157s QX7		80 ± 16	1 ± 1
158s QX8		60 ± 16	2 ± 1

ANNEXES

159s QX9		35 ± 4	14 ± 3
160s QX10		50 ± 10	11 ± 2
161s QX11		51 ± 1	$5,0 \pm 0,6$
162s QX12		39 ± 7	$11,5 \pm 0,4$

ANNEXE II

Récapitulatif des 128 descripteurs utilisés dans le logiciel VolSurf+ (28 descripteurs de la sonde H₂O, 24 descripteurs de la sonde DRY, 6 descripteurs de la sonde O et 6 descripteurs de la sonde N1, 40 descripteurs ne dérivant par des champs d'interaction moléculaire).

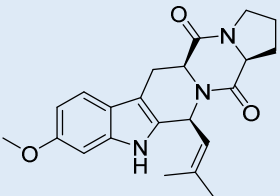
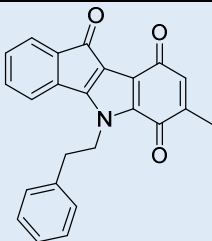
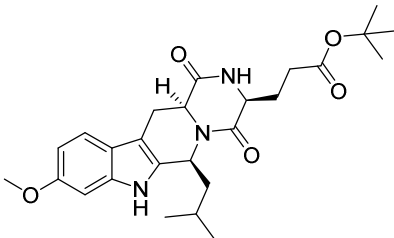
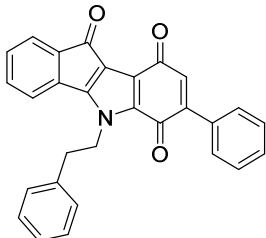
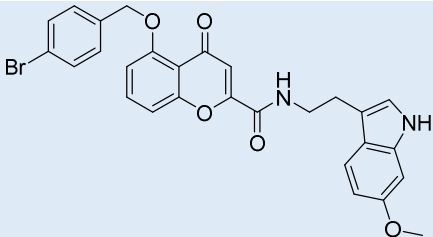
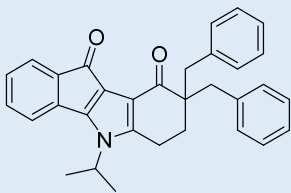
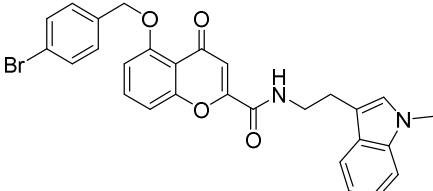
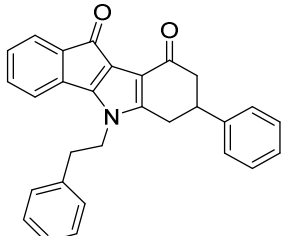
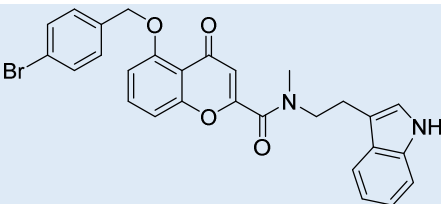
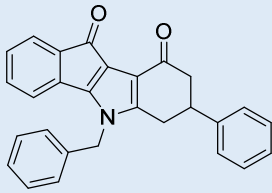
Catégories	Descripteurs
Forme et taille	Volume moléculaire
	Surface moléculaire
	Rugosité
	Globularité moléculaire
	Paramètres de flexibilité
Régions hydrophiles	Volumes hydrophiles
	Facteurs de compacité
Régions hydrophobes	Volumes hydrophobes
	Facteurs de compacité
	Différences des volumes hydrophobes
Moments d'énergie d'interaction	
Régions donneur/accepteur de liaison H	Volumes donneurs de liaisons H
	Volumes accepteurs de liaisons H
Descripteurs divers	Equilibre hydrophile-lipophile
	Moments amphiphiles
	Critical packing
	Polarisabilité
	Diffusivité
	Masse moléculaire
	LogP octanol/eau
	LogP cyclohexane/eau
	Log D
	Aire des surfaces polaires et hydrophobes
Etats de charge	Nombre de centres chargés
	Espèces non chargées disponibles
	Pourcentage d'espèces non ionisées

Descripteurs pharmacophoriques 3D	Aire déterminée par les triplets 3D pharmacophoriques
Modèle ADME	Solubilité intrinsèque
	Solubilités à différents pH
	Coefficient du profil de solubilité
	Perméabilité CACO2
	Perméabilité de la peau
	Pourcentage de liaison à la protéine
	Log (distribution de la barrière hémato-encéphalique)
	Stabilité métabolique
	Distribution volumique
	High Throughput Screening Flag

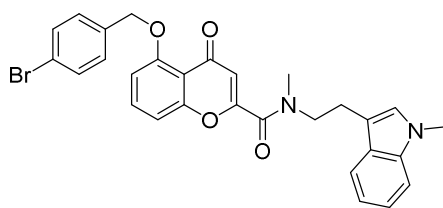
ANNEXE III

Composés constituant le training set utilisé pour le criblage virtuel “Ligand-Based” pour les sites 3 et 4.

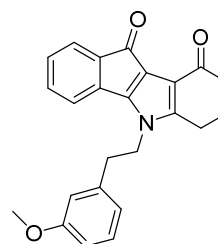
Site Inhibition de l'activité ATPasique – Site 4

1i FTC		17i	
2i Ko143		18i	
3i		19i	
4i		20i	
5i		21i	

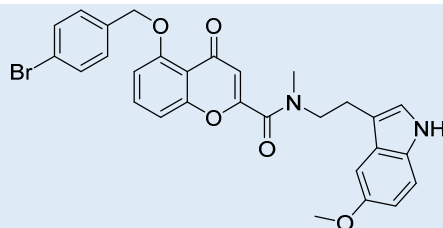
6i



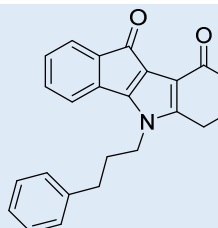
22i



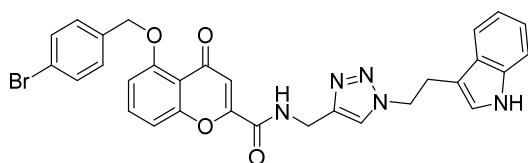
7i



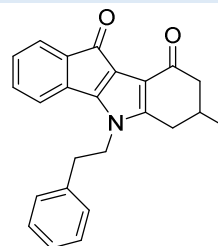
23i



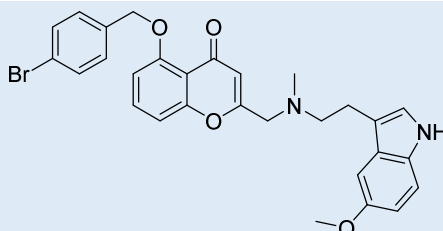
8i



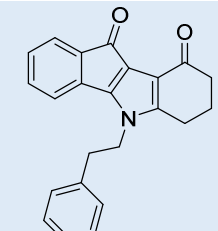
24i



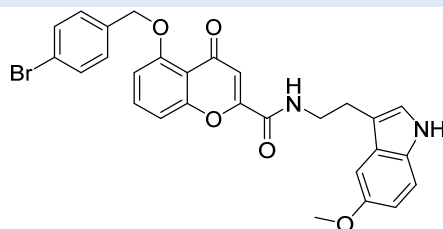
10i



25i

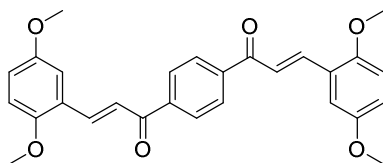


11i
MBL-
II-
141

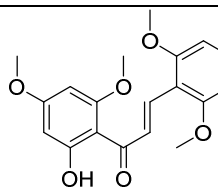


Site Stimulation de l'activité ATPasique – Site 3

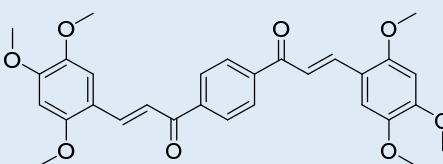
5s



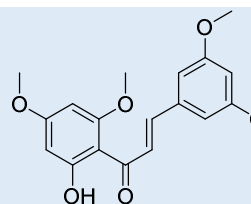
114s



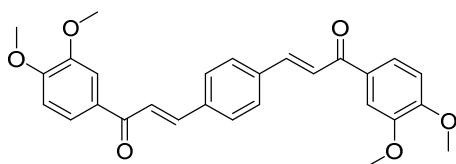
9s



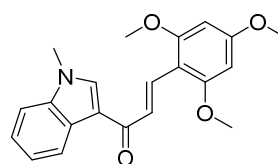
115s



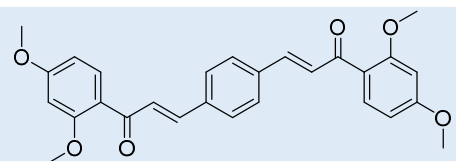
21s



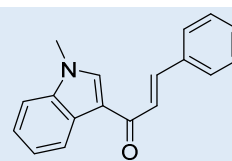
124s



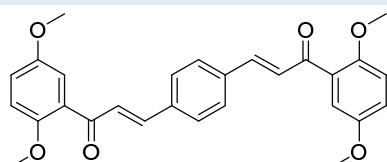
22s



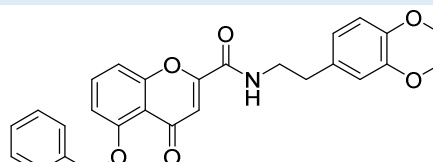
126s



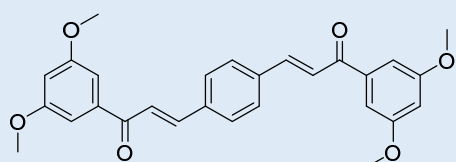
24s



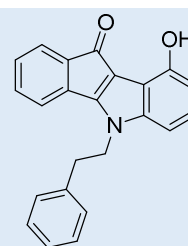
136s



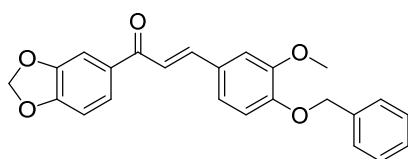
26s



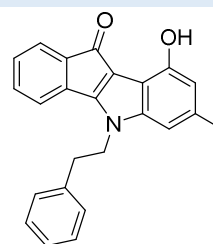
143s



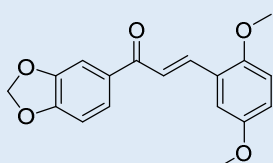
54s



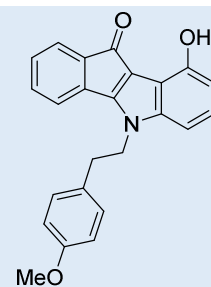
145s



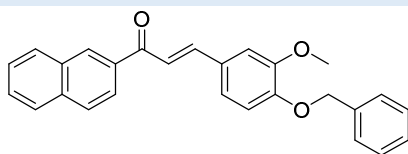
55s



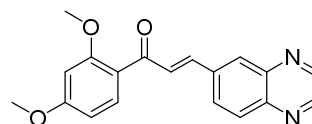
147s



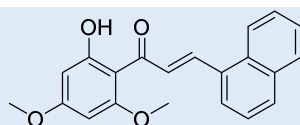
78s



154s



83s



ANNEXE IV

Résultats des criblages « ligand-based ». Valeurs des AUC (aire sous la courbe) et paramètres discriminant pour le site 3 (A) et le site 4 (B).

A)

Modèles Pharmacophores	Contraintes	CHAMPS		PSEUDO-CHAMPS	
		AUC	Paramètres	AUC	Paramètres
5S	/	0,85	DRY	0,78	DRY
	1_A	0,84	DRY	0,77	DRY
	21_A	0,80	O	0,78	DRY
	20_D	0,64	Distance_1	0,78	DRY
	1_A ET 21_A	0,63	DRY	0,73	Glob-Prod
	1_A ET 20_D	0,76	DRY*O	0,66	Distance_1
	21_A ET 20_D	0,75	Glob-Sum	0,75	Glob-Sum
3_1S	/	0,73	DRY	0,63	DRY
	1_A	0,79	DRY	0,64	H*O*N1
	9_A	0,75	O	0,71	H*N1
	8_D	0,63	N1*O	0,61	H*O*H
	1_A ET 9_A	0,70	N1	0,74	N1
	1_A ET 8_D	0,65	H*O*H	0,63	DRY*O
	9_A ET 8_D	0,75	Glob-Sum	0,78	Glob-Sum
3_2S	/	0,79	DRY	0,72	DRY
	1_A	0,72	DRY	0,71	DRY
	9_A	0,76	O	0,69	DRY
	8_D	0,58	DRY	0,62	H
	1_A ET 9_A	0,57	H*O*H	0,69	N1
	1_A ET 8_D	0,68	H*O	0,61	H*N1*H
	9_A ET 8_D	0,75	Glob-Sum	0,75	Glob-Sum
3_3S	/	0,87	DRY	0,83	DRY
	1_A	0,95	DRY	0,86	DRY
	13_A	0,81	DRY	0,73	Glob-Prod
	12_D	0,57	DRY*O	0,64	Glob-Prod
	1_A ET 13_A	0,82	H*O*N1	0,83	DRY
	1_A ET 12_D	0,72	H*N1	0,72	H*O*DRY
	13_A ET 12_D	0,75	Glob-Sum	0,69	Glob-Sum
5S_VolSurf	/	0,88	DRY	0,83	DRY
	1_A	0,88	DRY	0,91	DRY
	18_A	0,80	O	0,69	H*DRY*N1

ANNEXES

3S_VolSurf	17_D	0,57	H*O*H	0,61	Glob-Sum
	1_A ET 18_A	0,72	H*O*H	0,74	N1*DRY
	1_A ET 17_D	0,65	DRY*O	0,64	H
	18_A ET 17_D	0,75	Glob-Sum	0,75	Glob-Sum
	/	0,86	H*DRY/DRY	0,84	DRY
	1_A	0,94	H*DRY	0,93	DRY
	14_A	0,84	DRY	0,73	DRY
	13_D	0,60	O	0,65	H*O*RY
	1_A ET 14_A	0,60	H*O*DRY	0,65	H*N1*H
	1_A ET 13_D	0,76	N1*DRY	0,73	H*DRY*H
	14_A ET 13_D	0,75	Glob-Sum	0,73	H*N1*H

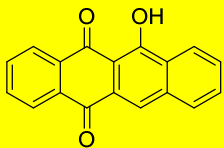
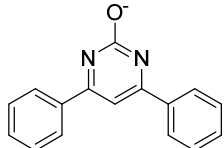
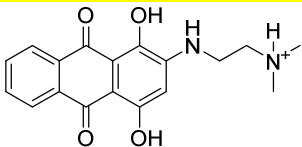
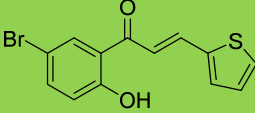
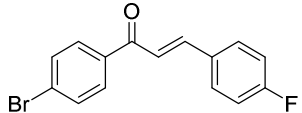
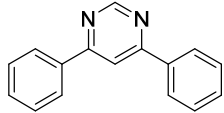
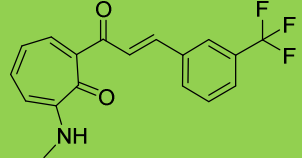
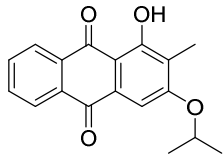
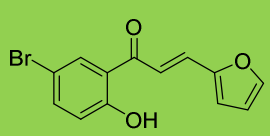
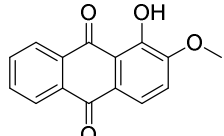
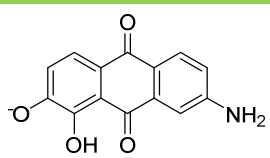
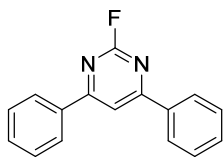
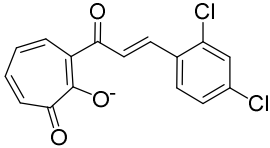

B)

Modèles pharmacophores	Contraintes	CHAMPS		PSEUDO-CHAMPS	
		AUC	Paramètres	AUC	Paramètres
5I	/	0,97	H*O*N1	0,84	Glob-Prod
	5_A	0,89	H*O*N1	0,85	Glob-Prod
	19_A	0,99	N1*O	0,84	O
	20_A	0,95	H*O*N1	0,86	Glob-Prod
	9_D	0,67	DRY*O	0,65	O
	14_D	0,69	Glob-Prod	0,68	Glob-Prod
	19_A ET 20_A	0,69	Glob-Sum	0,68	Glob-Sum
3_1I	/	0,95	H*O*N1	0,75	Glob-Prod
	1_A	0,92	H	0,77	Glob-Prod
	19_D	0,70	Glob-Prod	0,68	H*O*N1
3_2I	/	0,93	H*N1*H	0,71	O
	9_A	0,82	H*N1*H	0,73	Distance_1
	10_10	0,64	Glob-Sum	0,71	O
3_3I	/	0,75	H	0,76	O
	12_A	0,72	H	0,74	O
5I_VolSurf	/	0,78	H*N1*H	0,74	O
	1_A	0,71	H*N1	0,75	O
	15_A	0,85	H	0,75	O
	1_A ET 15_A	0,70	H*DRY	0,73	H*O*H
3I_VolSurf	/	0,85	H	0,82	Glob-Prod
	18_A	0,87	H	0,80	Distance_1
	6_D	0,69	Glob-Prod	0,72	O

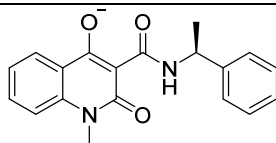
ANNEXE V

Sélection des composés issus du criblage virtuel du site 3. A) Selon le descripteur H*DRY en mode champs (en vert les trois composés sélectionnés communs avec le descripteur DRY, en jaune les composés sélectionnés pour le descripteur H*DRY). B) Selon le descripteur DRY en mode pseudo-champs (en vert les trois composés sélectionnés communs avec le descripteur H*DRY, en jaune les composés sélectionnés pour le descripteur DRY).

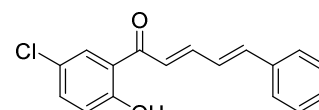
A)

Référence	Structure	Référence	Structure
AE-641/00187058		AC-907/25005317	
AO-476/43417003		AN-646/41051368	
AE-848/32770027		AC-907/25005311	
AP-355/41582938		AN-967/15488035	
AN-646/41051369		AE-848/01284025	
AE-562/43458218		AC-907/34111006	
AP-355/40779902		AK-968_14004089	

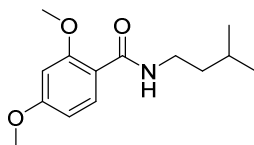
AH-034_08462038



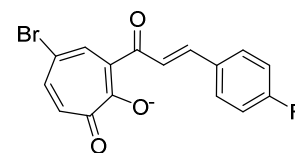
AJ-091/40652509



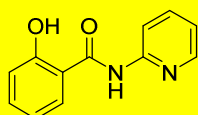
AO-548/14925672



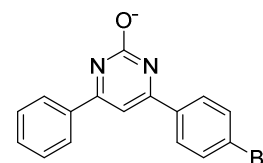
AP-355/42609651



AE-641/02605026



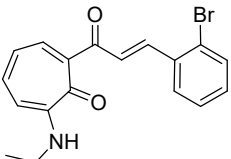
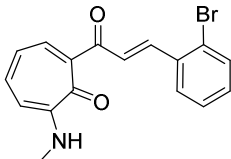
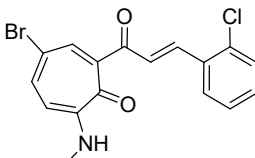
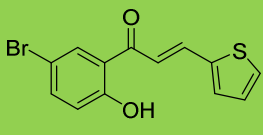
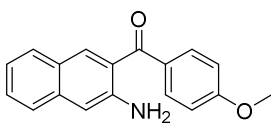
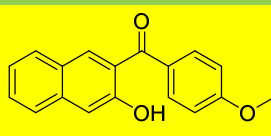
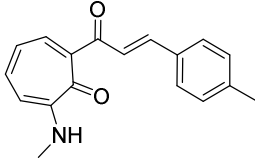
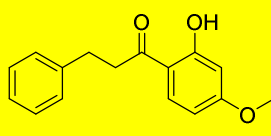
AG-690/11629063



B)

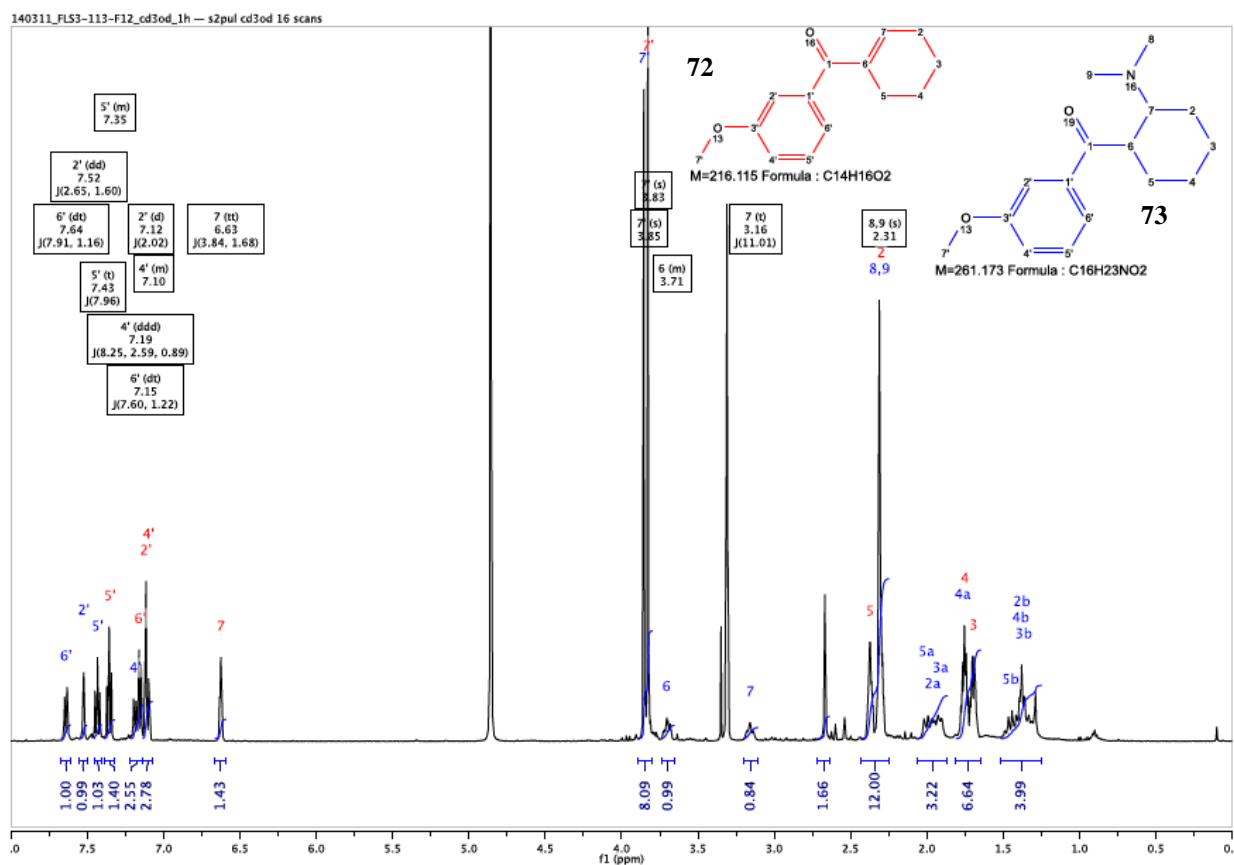
Référence	Structure		
AP-355/40850445		AP-355/40779896	
AN-646/41051369		AP-355/40779890	
AP-355/42008296		AP-355/42579249	
AG-690/36932102		AP-355/42579252	
AP-355/42539337		AP-355/41582938	
AP-355/42027029		AQ-911/42464333	

ANNEXES

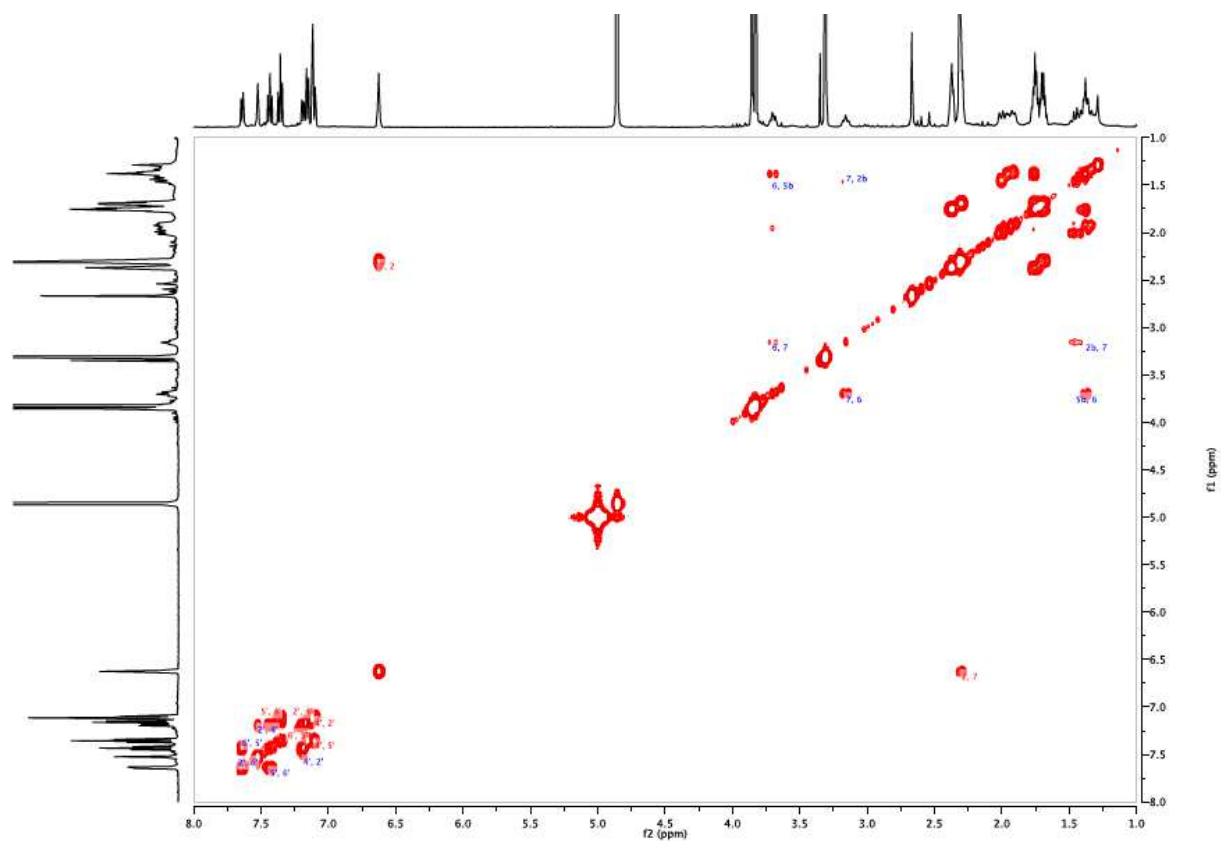
AP-355/42008318		AP-355/40779894	
AP-355/42539334		AN-646/41051368	
AK-830/13217104		AE-562/12222653	
AP-355/40779892		AK-087/42718243	

ANNEXE VI

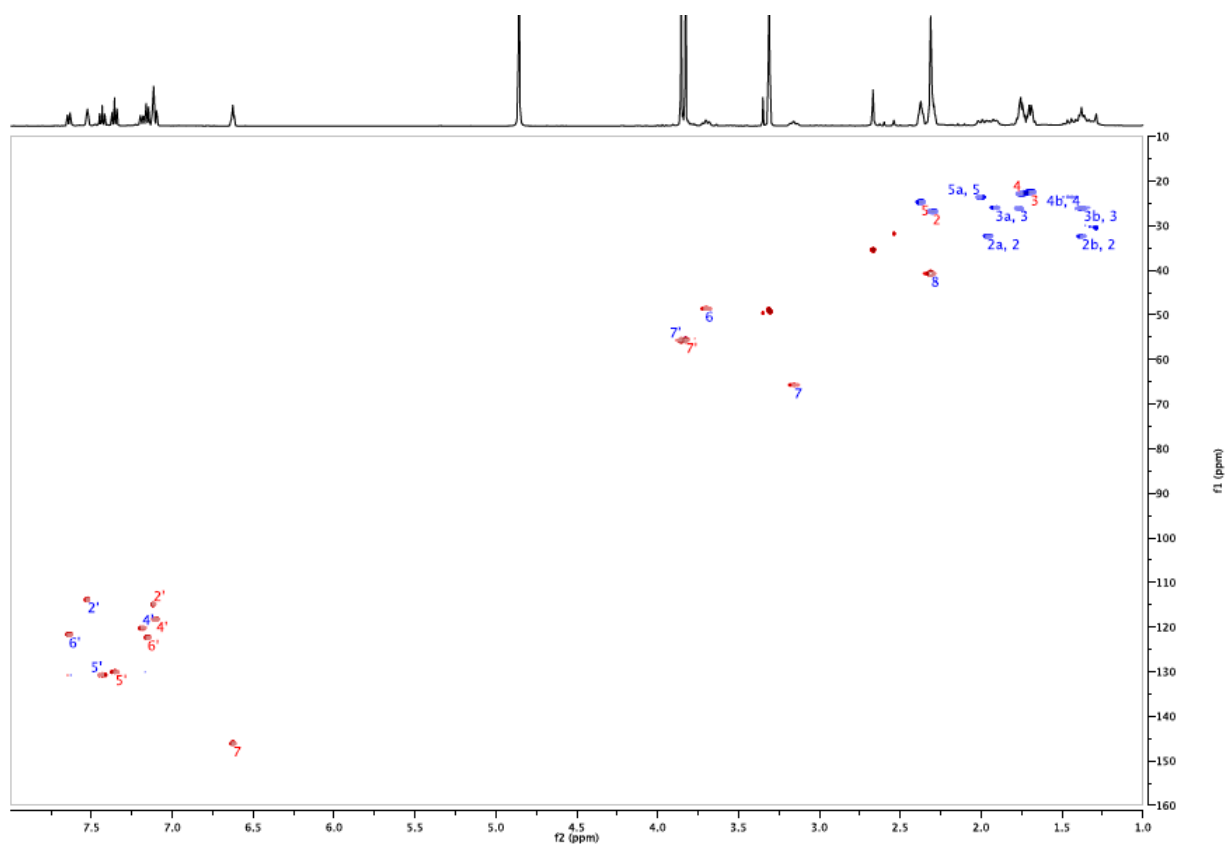
Analyses RMN et UHPLC-TOF-MS attestant de la présence des produits secondaires **72** et **73** formés lors de la synthèse biomimétique du tramadol.

A) Spectre RMN ^1H 

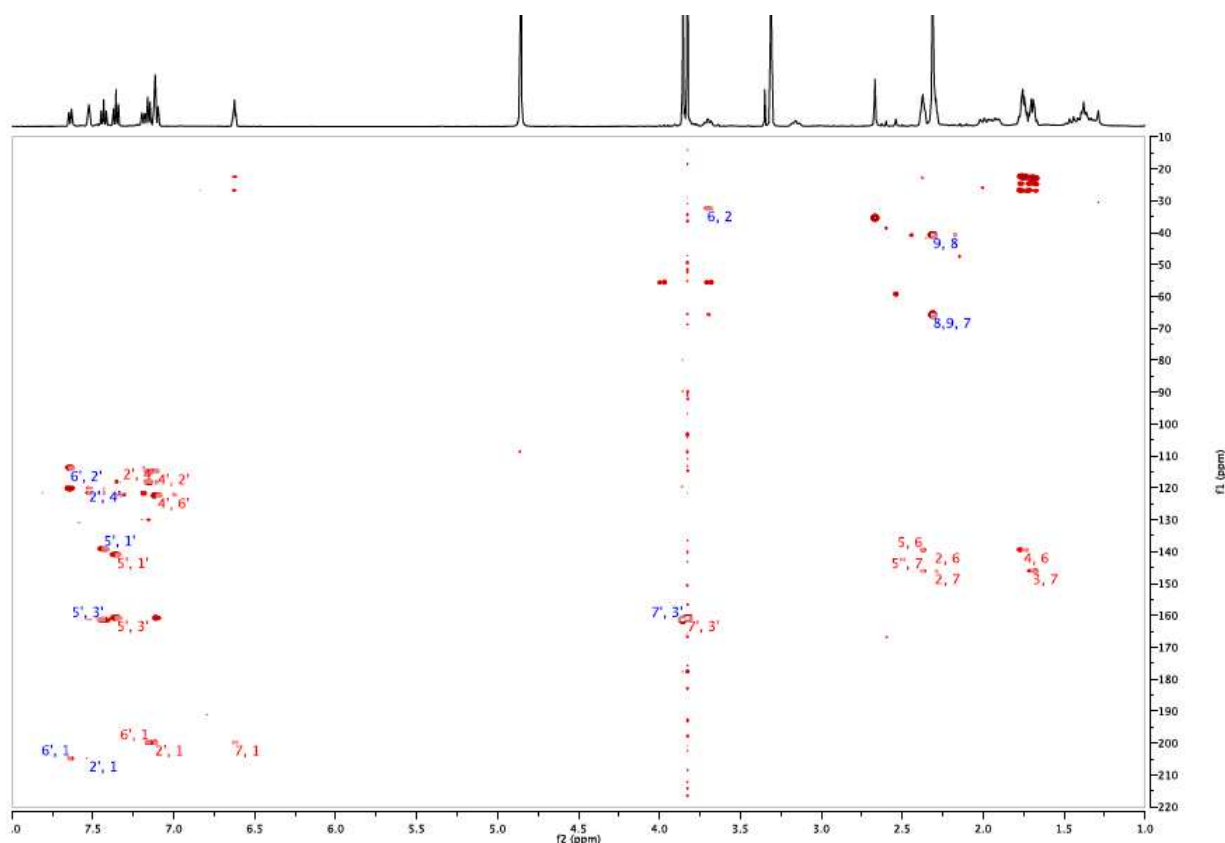
B) Spectre COSY



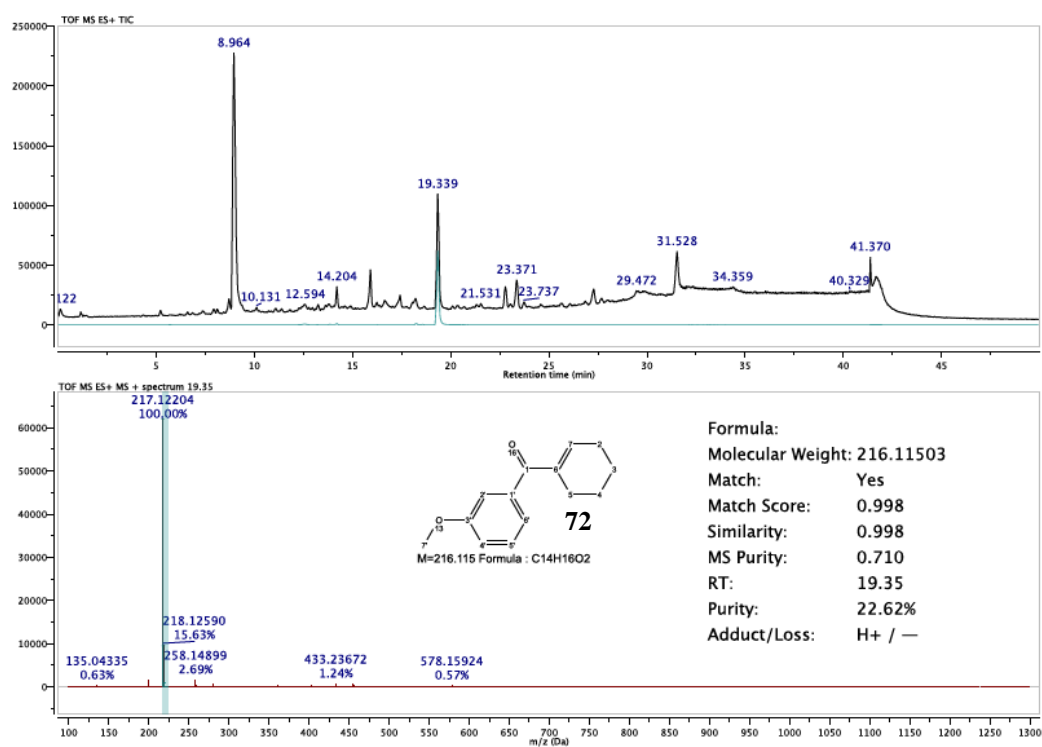
C) Spectre HSQC

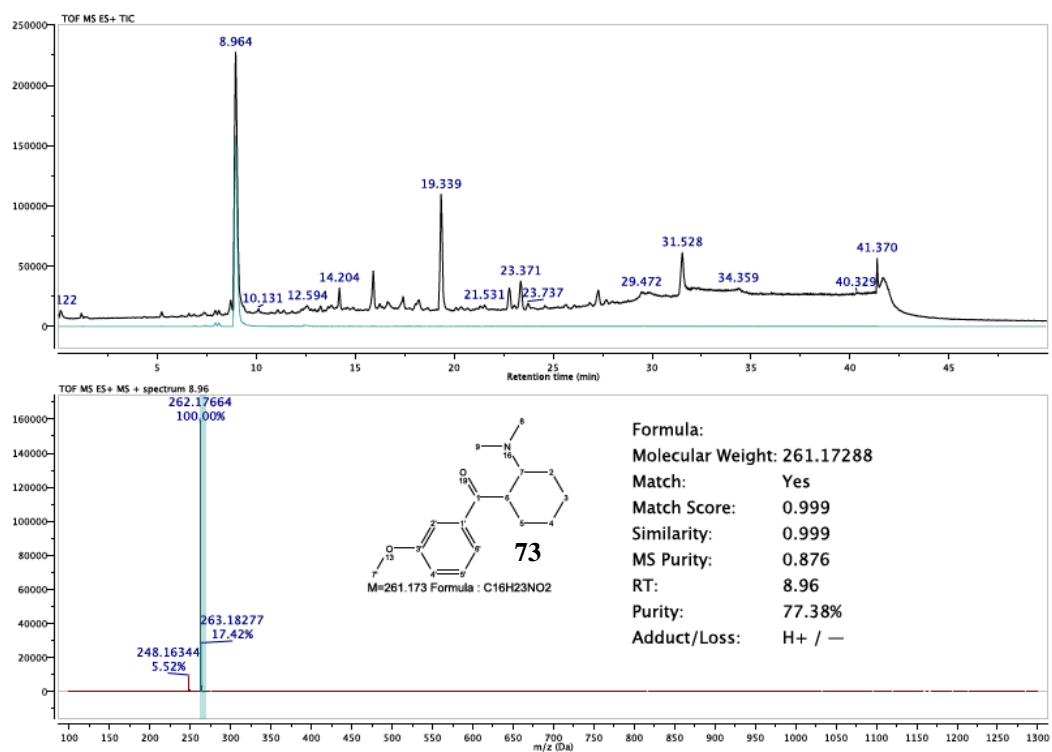


D) Spectre HMBC



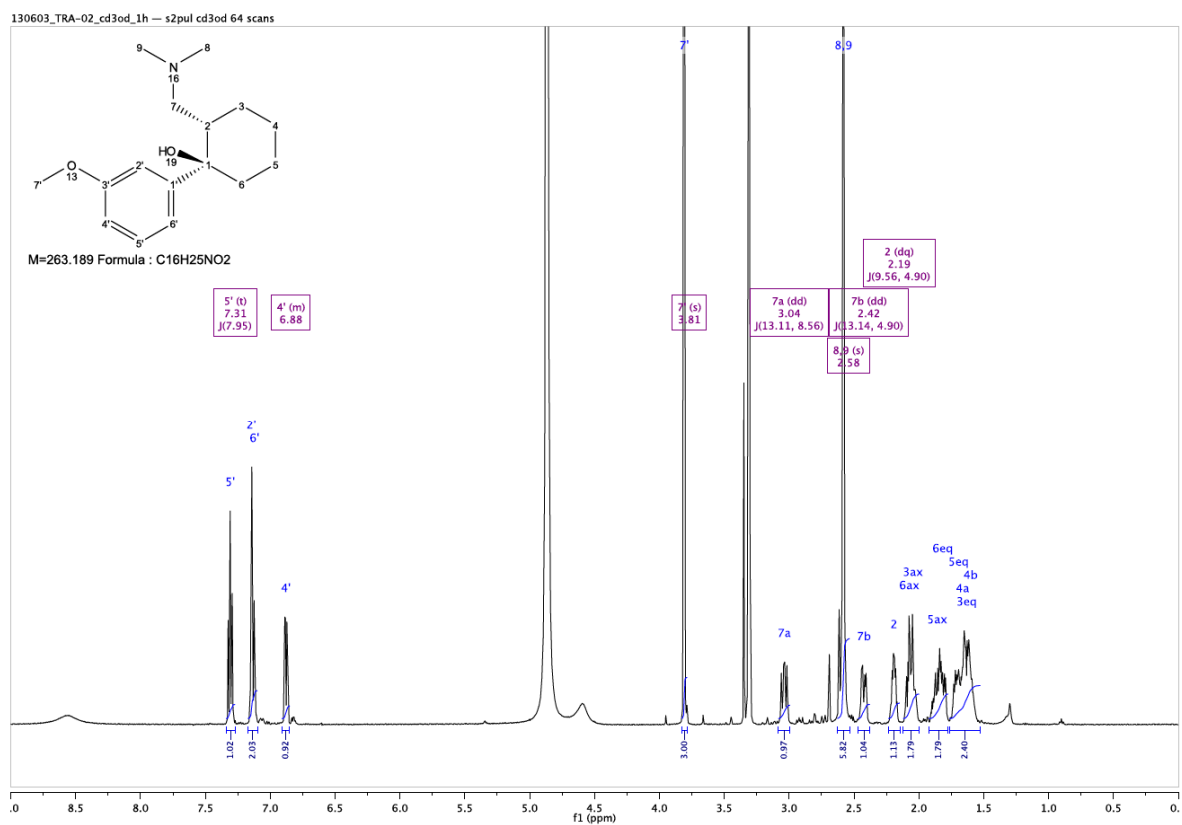
E) Spectres UHPLC-TOF-MS enregistrés en mode positif des composés 72 et 73





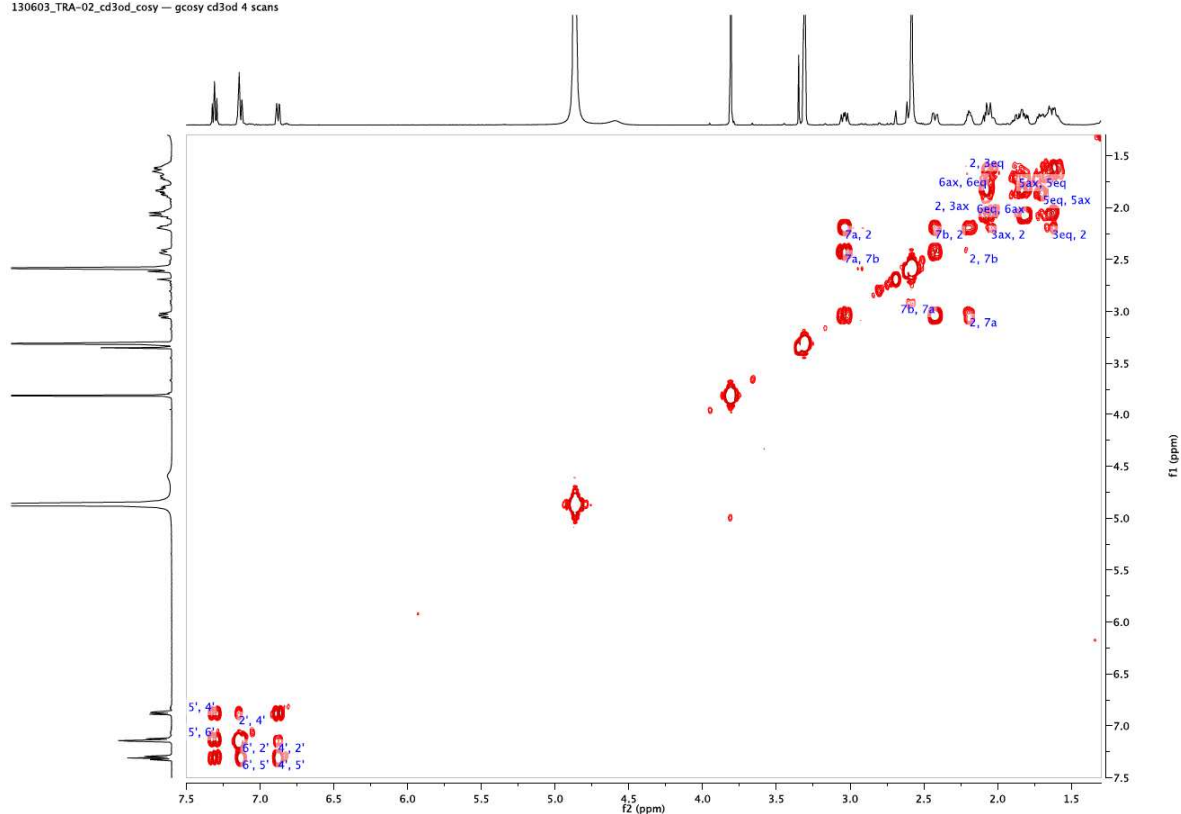
ANNEXE VII

Analyses RMN et UHPLC-TOF-MS des fractions 2 et 6 isolées lors de la purification par HPLC préparative et contenant deux diastéréoisomères du tramadol.

A) Spectre RMN ^1H de la fraction 2

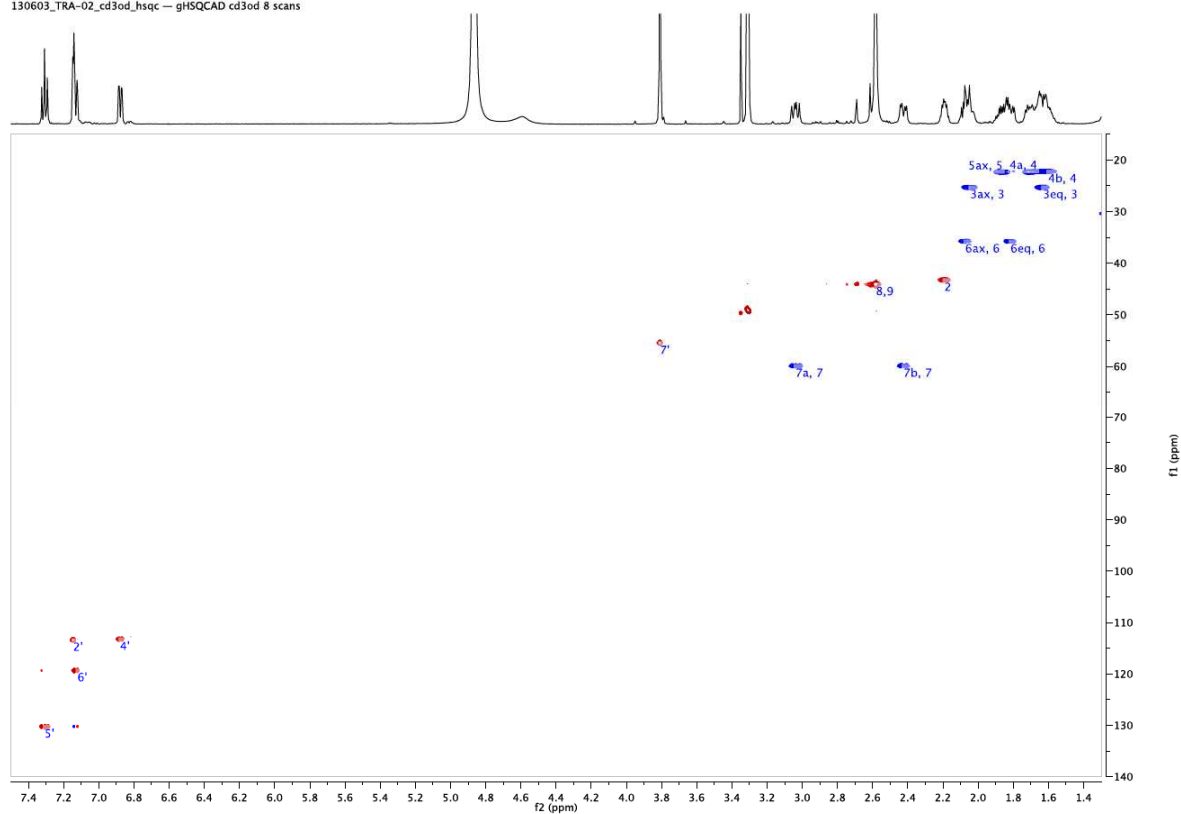
B) Spectre COSY de la fraction 2

130603_TRA-02_cd3od_cosy — gcosy cd3od 4 scans



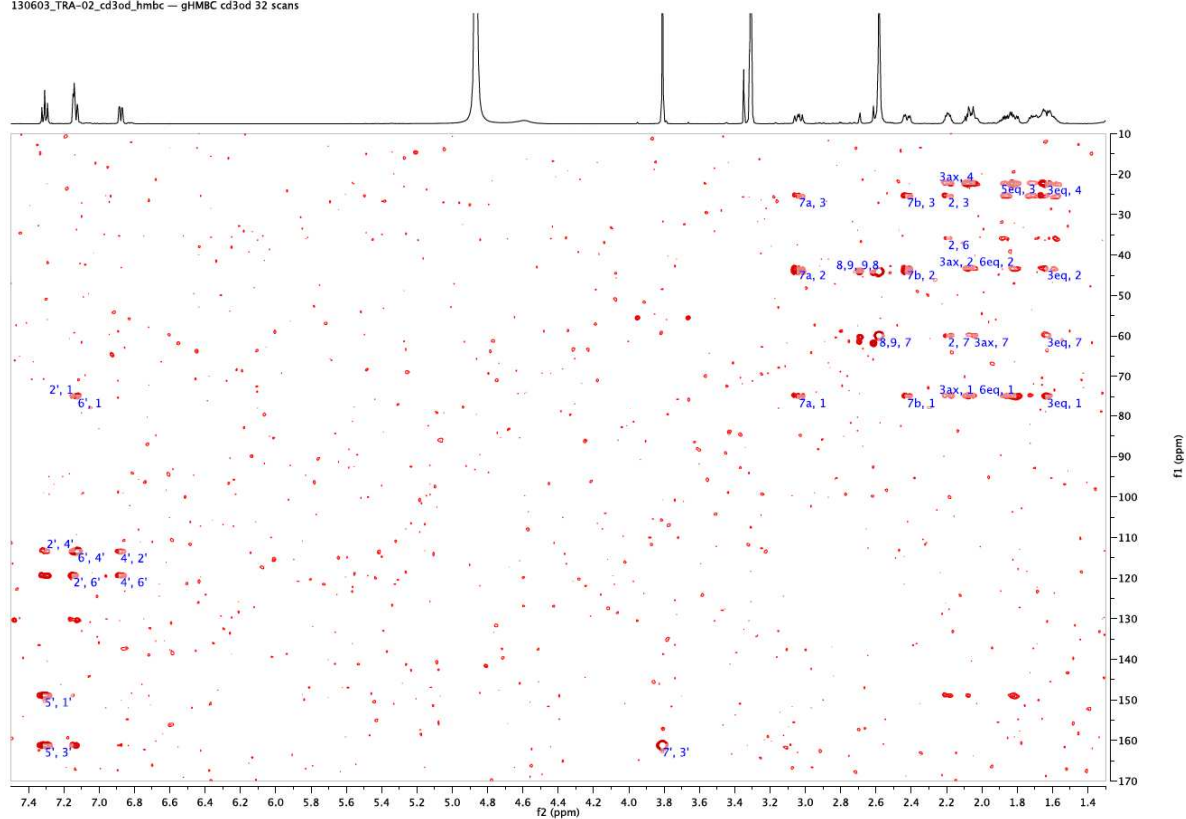
C) Spectre HSQC de la fraction 2

130603_TRA-02_cd3od_hsqc — gHSQCAD cd3od 8 scans

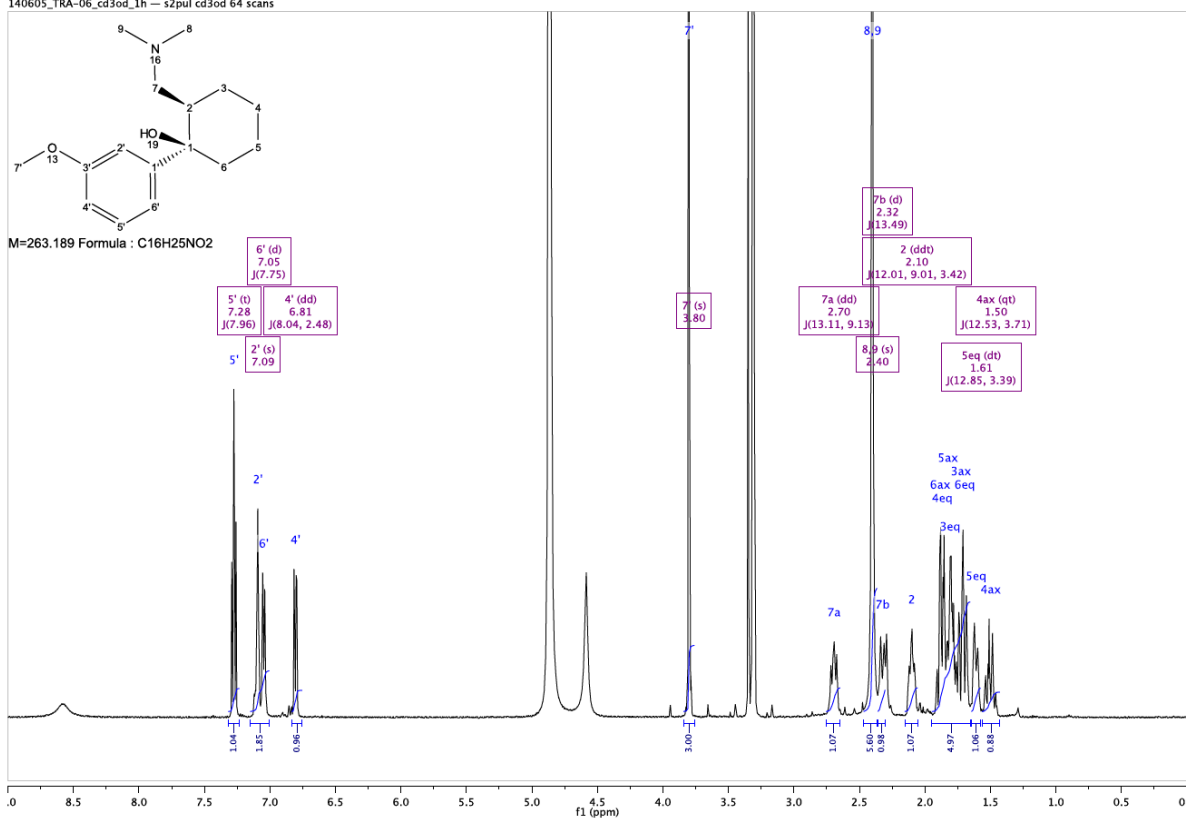


D) Spectre HMBC de la fraction 2

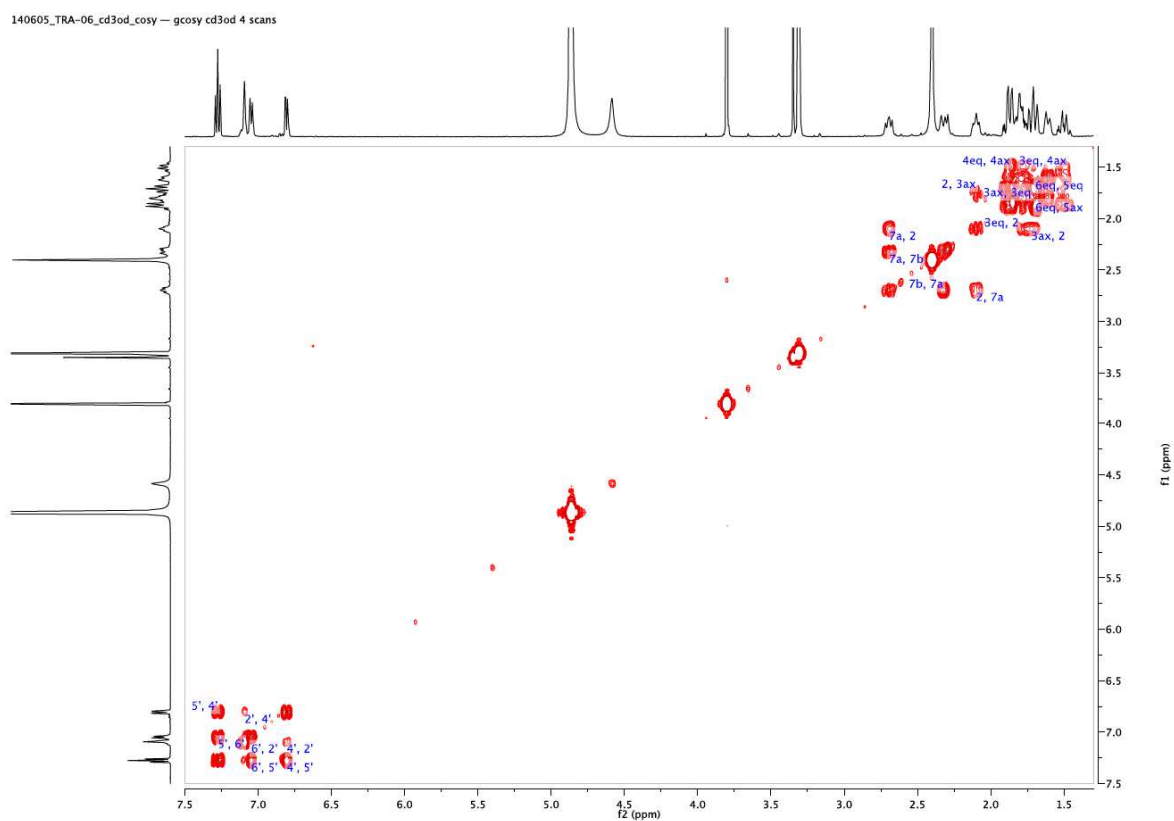
130603_TRA-02_cd3od_hmbc — gHMBC cd3od 32 scans

E) Spectre ^1H de la fraction 6

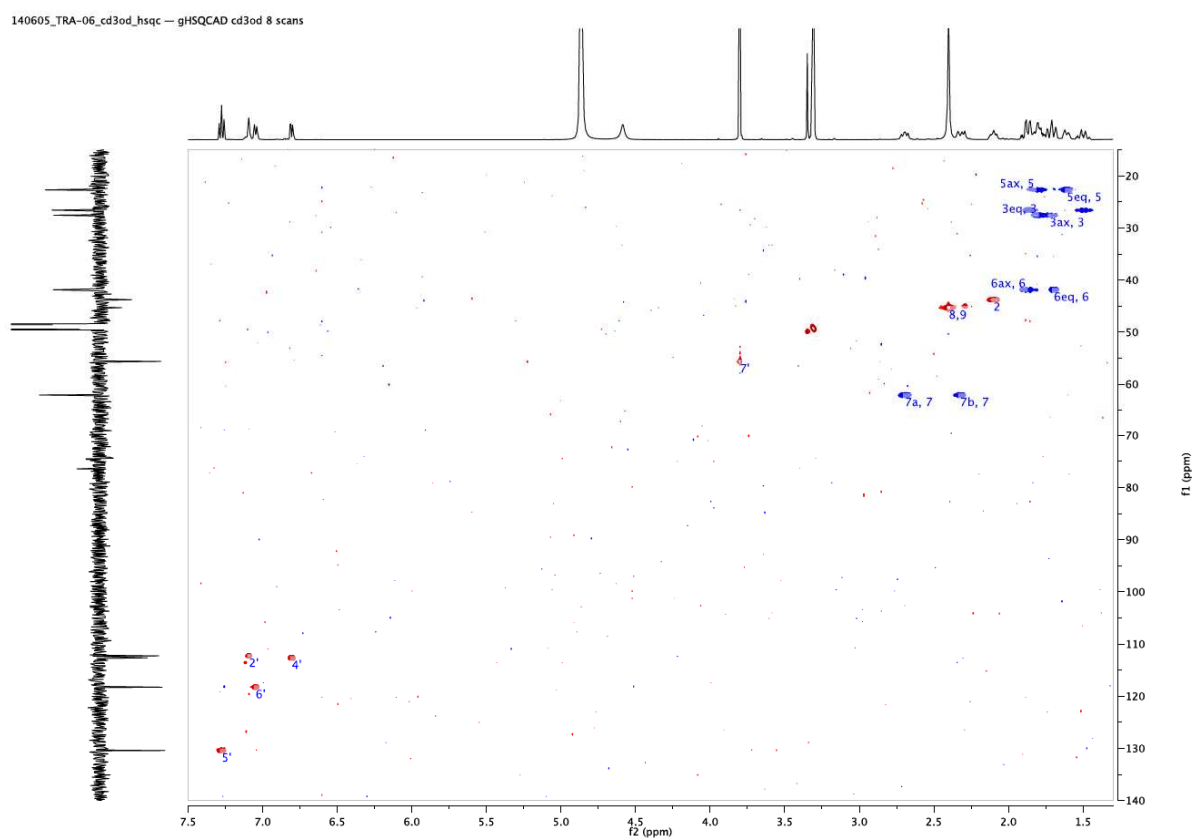
140605_TRA-06_cd3od_1h — s2pul cd3od 64 scans



F) Spectre COSY de la fraction 6

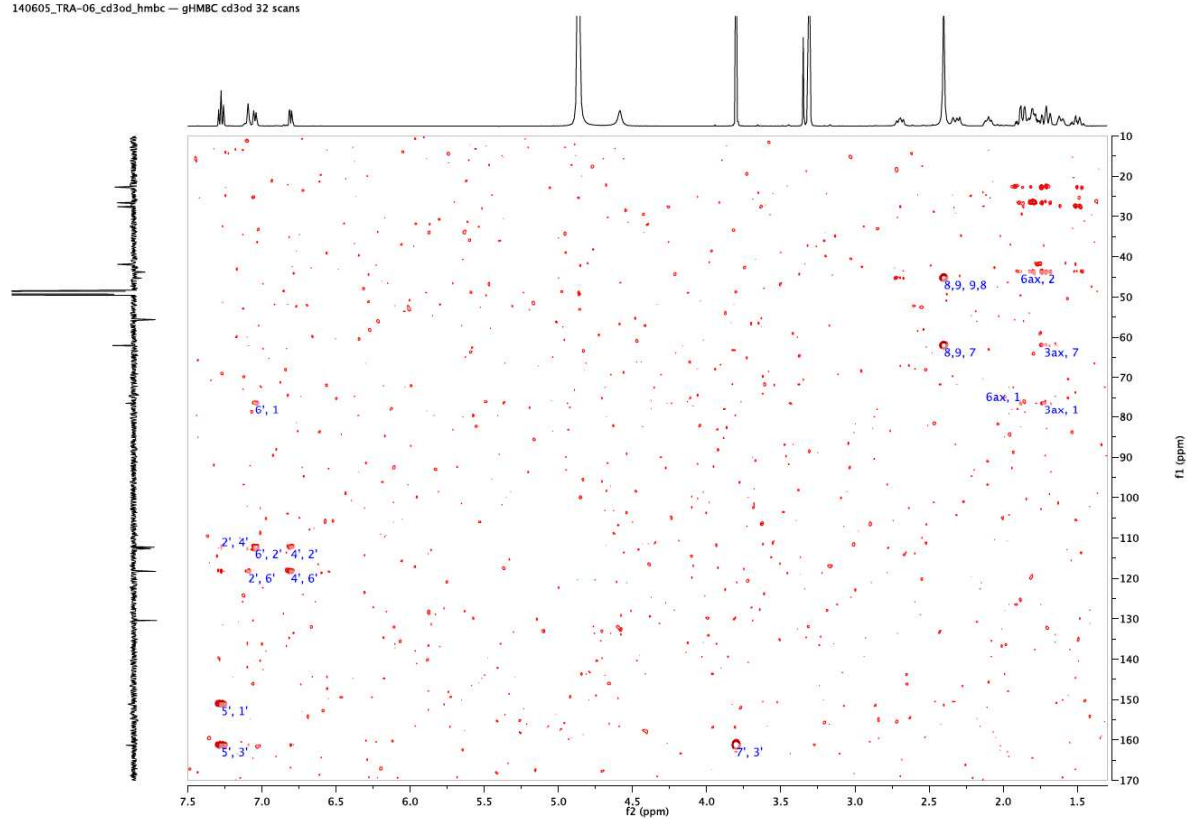


G) Spectre HSQC de la fraction 6



H) Spectre HMBC de la fraction 6

140605_TRA-06_cd3od_hmbc — gHMBC cd3od 32 scans



CONCEPTION ET DÉVELOPPEMENT DE NOUVEAUX LIGANDS DES TRANSPORTEURS
ABCG2 ET MRP1 DANS LE CADRE DE LA RÉSISTANCE À DE MULTIPLES DROGUES
ANTICANCÉREUSES.

Résumé :

La résistance à de multiples drogues anticancéreuses (Multidrug Resistance ou MDR) est actuellement un problème majeur dans le cas de nombreuses chimiothérapies. Parmi les mécanismes à l'origine de la MDR, la surexpression de protéines membranaires de type ABC est le plus étudié. Les deux protéines ABCG2 et MRP1 sont parmi les protéines membranaires impliquées. Ces transporteurs sont capables d'induire un efflux massif des agents anticancéreux hors des cellules cancéreuses, réduisant ainsi leur concentration intracellulaire et donc leur efficacité thérapeutique. Afin de contrecarrer cette chimiorésistance, notre objectif s'est concentré sur le développement de nouveaux modulateurs d'ABCG2 et de MRP1. Dans ce cadre, de nouveaux inhibiteurs d'ABCG2, dérivés de chromones, ont été conçus afin de restaurer la sensibilité des cellules cancéreuses aux agents anticancéreux. De plus, la modélisation de modèles pharmacophores nous a permis d'obtenir de nouvelles informations quant aux interactions ABCG2-ligands. Les nouveaux modulateurs de MRP1, dérivés de flavonoïdes, sont capables quant à eux d'induire un efflux massif de glutathion cellulaire via MRP1, sans être transportés eux même, entraînant l'apoptose sélective des cellules cancéreuses surexprimant le transporteur.

Mots clé : ABCG2, MRP1, flavonoïdes, modulateurs, chimiorésistance, chimiothérapie ciblée.

DESIGN AND DEVELOPMENT OF NEW LIGANDS OF ABCG2 AND MRP1 TRANSPORTERS
TARGETING THE MULTIDRUG RESISTANCE (MDR).

Abstract:

Resistance to chemotherapeutic agents (Multidrug Resistance or MDR) is a major hurdle for anticancer chemotherapy. Among different mechanisms involved in MDR, the overexpression of membrane proteins belonging to ABC family is the most relevant one. Among such proteins, ABCG2 and MRP1 are considered to play an important role. These transporters are able to induce a massive efflux of anticancer agents out of the cancer cells, reducing their intracellular concentration and their therapeutic potency. In order to overcome this resistance, novel modulators of ABCG2 and MRP1 were designed, synthesized and tested biologically. In this context, new derivatives of chromones as inhibitors of ABCG2 were developed in order to restore sensitivity of cancer cells to chemotherapeutic agents. In addition, molecular modelling of new pharmacophores allowed us to gather new data exploring ABCG2-ligand interactions. New modulators of MRP1, derivatives of flavonoids, are able to induce a massive efflux of intracellular glutathione that is mediated by the protein, without being transported and causing selective apoptosis of cancer cells overexpressing MRP1.

Keywords: ABCG2, MRP1, flavonoids, modulators, multidrug resistance, selective chemotherapy.

^a Équipe MedChem – Département de Pharmacochimie Moléculaire (DPM) – UMR 5063 – Bâtiment E Pôle Chimie – BP53 – 38041 Grenoble Cedex 9 – France. ^b Section des Sciences Pharmaceutiques – Faculté des Sciences – Université de Genève – 30, quai Ernest Ansermet – 1211 Genève 4 - Suisse